

**Charakterisierung ausgewählter molekularer und zellulärer
Adhäsionsmechanismen an artifiziellen Oberflächen**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Thomas Weihe

geb. am 28 August 1975

in Bad Oeynhausen, Deutschland

Rostock, November 2012

Gutachter:

1. Gutachter:
Prof. Dr. habil. Jan Gimsa
Lehrstuhl für Biophysik, Universität Rostock

2. Gutachter
PD. Dr. habil. Gerd-Uwe Flechsig
Institut für Chemie, Universität Rostock

Datum der Einreichung: 01.11.2012

Datum der Verteidigung: 15.04.2013

Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis	IV
2	Einleitung.....	1
3	Theorie.....	6
3.1	Oberflächenwechselwirkung	6
3.1.1	Hintergründe	6
3.1.2	Spermidingleichgewicht	8
3.2	Molekülmechanik	10
3.2.1	Fibronectin	10
3.2.2	Heparin	11
3.2.3	Allgemeines zur Single-Molecule Force Spectroscopy	11
3.2.4	Polymermodelle	12
3.3	Zellmechanik.....	14
3.3.1	Fibroblastenadhäsion	14
3.3.2	Charakterisierung der verwendeten Materialien.....	15
3.3.3	Integrine	18
3.3.4	Zytomechanik	19
4	Material und Methoden	22
4.1	Rastersondenmikroskopie (AFM)	22
4.1.1	Allgemein.....	22
4.1.2	Imaging	22
4.1.3	Dynamische Kraftmessungen	23
4.2	Material und Methoden: unspezifische Bindung	25
4.2.1	Elektrophorese	25
4.2.2	Kraftspektroskopie	25
4.2.3	Aufbau des Modellsystems	28
4.2.4	Spermidin	28
4.3	Material und Methoden: spezifische Bindung	29

4.4	Zellkultur.....	31
4.4.1	Anzuchtbedingungen.....	31
4.4.2	Kulturmedien und Messmedien	31
4.4.3	Single-Cell Force Spectroscopy.....	32
5	Ergebnisse und Diskussion	34
5.1	Charakterisierung der Zell-Oberflächen-Schnittstelle: unspezifische Bindung.....	34
5.1.1	Elektrophoretische Bestimmung der Oberflächenladungsdichte	34
5.1.2	pH-Abhängigkeit der spermidinvermittelten Attraktion.....	35
5.1.3	Konzentrationsabhängigkeit der spermidinvermittelten Attraktion	37
5.1.4	Umschlagpunkt des Effekts	39
5.2	Charakterisierung der Zell-Oberflächen-Schnittstelle: spezifische Bindung.....	41
5.2.1	Beschreibung des Systems	41
5.2.2	Mechanische Entfaltung von Fibronectin	41
5.2.3	Hat die Destabilisierung des Fibronectins ihre Ursachen in teilentfalteten Domänen.	42
5.3	SCFS-spezifische Auswertung rheologischer Daten	47
5.3.1	Hertzsche Pressung	47
5.3.2	Viskoelastische Betrachtung der Zelleigenschaften.....	48
5.3.3	Kraftabhängige Viskoelastizität (Anwendung des Kelvin-Voigt Modells)	48
5.4	Zelladhäsion und Rheologie auf verschiedenen Oberflächen.....	50
5.4.1	Initiale Adhäsion in Abhängigkeit von der Oberflächenbeschaffenheit und dem rheologischen Verhalten muriner Fibroblasten	50
5.4.2	Hertzsche Pressung auf verschiedenen Oberflächen.....	57
5.4.3	Oberflächennormierte Zelladhäsion muriner Fibroblasten (Abhängigkeit der Rauheit)	60
6	Zusammenfassung.....	64
7	Ausblick.....	65
8	Anhang.....	i
1.1	Abkürzungsverzeichnisse	i
1.1.1	Poisson-Boltzmann-Gleichung.....	i

8.1.1	Mechanik	iii
8.1.2	Anhang: Poisson-Boltzmann-Gleichung	v
8.1.3	Mechanik	xvii
8.1.4	Bedeutung der Poisson-Zahl.....	xix
8.1.5	Viskoelastische Eigenschaft von Zellen	xx
8.1.6	Voigtmodell zur Beschreibung viskoelastischer Körper	xxi
8.1.7	Hertzmodell zur Beschreibung elastischer Körper	xxviii
9	Literaturverzeichnis	xxxvi
10	Liste eigener Veröffentlichungen	xlvi
10.1	Publikationen.....	xlvi
10.2	Konferenzbeiträge	xlvi
10.3	Posterbeiträge	xlix
11	Selbständigkeitserklärung	I
12	Danksagungen	li

1 Abkürzungsverzeichnis

a	Kontaktflächenradius
A_c	Kontaktfläche
AFM	Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy)
Al	Aluminium
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
D 10	DMEM/10% fötales Kälberserum
ΔL_c	Konturlängenzunahme
DEGA	Asparaginsäure, Glycin, Glutaminsäure, Alanin, spezifische Bindungsstelle
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek-Theorie
DMEM	Dulbecco's Modified Medium
E	elektrische Feldstärke
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
ϵ	Dehnung
F	Kraft
f_1, f_2, f_3, f_4	pH-abhängige Kraftbeiträge
FGF	Fibroblast Growth Factor
FJC	Freely-Jointed-Chain Modell
FN	Fibronectin
FNI	Fibronectin Domäne I

FNII	Fibronektin Domäne II
FNIII	Fibronektin Domäne III
F_{rel}	relative Kraft
H	Wasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
ISO	International Organization for Standardization
K_1, K_2, K_3	Gleichgewichtskonstanten
k_B	Boltzmann-Konstante
KCl	Kaliumchlorid
k_f, k_r	Geschwindigkeitskonstanten
$k_{\text{on}}, k_{\text{off}}$	Geschwindigkeitskonstanten
KPFM	Kelvin-Probe-Force Microscopy
L929	murine Fibroblasten
l	Segmentlänge
L_c	Konturlänge
l_k	Kuhnlänge
l_p	Persistenzlänge
MIDAS	metal-ion dependent adhesion site
MW	Mittelwert
$\langle n \rangle$	Durchschnittliche Anzahl vorhandener Bindungen
ν	Poissonzahl
n	Anzahl

N	Stickstoff
N_A, N_B, N_C	Stickstoffatome in der Spermidin- kette
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Natriumsalz der Orthophosphorsäure
Nb	Niob
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)
n_r, n_l	Dichte der Reaktionspartner
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PDB	Protein Data Base
PC	Polykarbonat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PS	Polystyrol
Pt	Platin
R	Kugelradius
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure, spezifische Bindungsstelle
σ	Spannung
SA	Standardabweichung
SCFS	Ein-Zell-Kraftspektroskopie (Single-Cell Force Spectroscopy)
SECM	Scanning Electrochemical Microscopy
Si	Silizium
SMD	steered molecular dynamics

SMFS	Ein-Molekül-Kraftspektroskopie (Single-Molecule Force Spectroscopy)
SP	Spermidin
STM	Rastertunnelmikroskopie (Scanning Tunnel Microscopy)
Θ	Öffnungswinkel
τ_0	Lebensdauer
t_1, t_2	Vektoren
Ti	Titan
TiO ₂	Titanoxid
V	Vanadium
WLC	Worm-Like-Chain-Modell

2 Einleitung

In der Bundesrepublik Deutschland schreitet die demographische Alterung voran, was sich auch in der Ausrichtung der medizinischen Forschung niederschlägt (Cooper et al., 1992). Es entstehen neue medizinische Herausforderungen wie die Heilung von Knochenschädigung nach altersbedingtem Verschleiß oder krankheitsbedingtem Verfall (Kotz et al., 2002). Fortgeschrittene Schädigung menschlicher Gelenke durch Arthrose, rheumatoider Arthritis, Durchblutungsstörungen, posttraumatischen Veränderungen oder angeborene Gelenkfehlbildungen sind Indikationen für Endoprothesen wie z.B. künstliche Gelenke (Zweymüller et al., 1988). Vor allem für Menschen

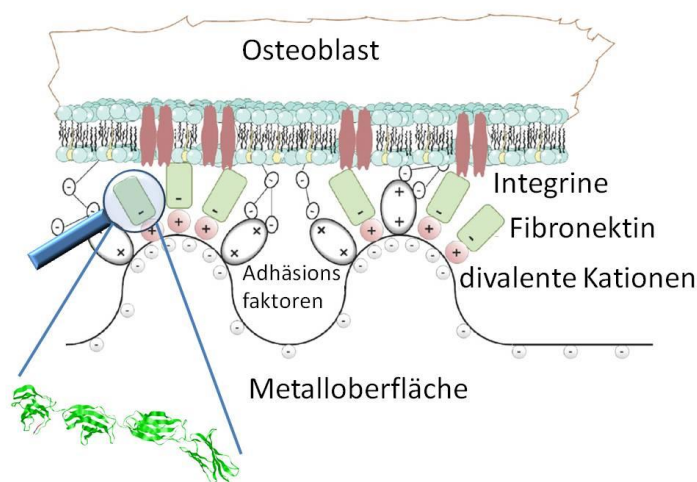


Abbildung 2.1.: Implantat-Gewebsschnittstelle nach Implantatsintegration (modifiziert nach Iglic et al 2011). Ausschnitt: modularer Aufbau Fibronektins.

fortgeschrittenen Alters sind Prothesen zur Erhaltung der Selbstständigkeit eine bedeutende Entwicklung der modernen Medizin (Field and Martin, 1991). Endoprothesen werden operativ in den Körper integriert, wobei geschädigtes Knochengewebe entfernt und die Prothese dauerhaft mit dem Knochen verbunden wird (Miller et al., 2008; Dozza et al., 2011). Das Implantat verwächst während der Regeneration nach der Operation

mit dem Knochen (Abbildung 2.1, Palumbo et al., 2011). Doch nicht nur unter diesem Gesichtspunkt ist die Knochenregeneration ein wichtiger medizinischer Forschungsgegenstand. Fernziel sind Systeme, die geschädigtes Gewebe gleichwertig ersetzen. Das Ziel des Tissue Engineering ist es, mittels gerichteter Zellkultivierung künstliches Gewebe als Ersatz für schadhafte Stellen zu züchten (Hutmacher, 2000; Yoshimoto et al., 2003; Rezwan et al., 2006; Di Silvio et al., 2008). Sowohl für die Implantatintegration als auch für die Kultivierung von Zellen sind Untersuchungen nötig, die zeigen, wie das Gewebe durch mechanische bzw. elektrische Reize aktiviert werden kann (Becker and Spadaro, 1972; Flieger et al., 1998; Hamid and Hayek, 2008). Um die Wirkmechanismen im Einzelnen zu verstehen, ist es zur Optimierung schon angewendeter Verfahren nötig, die Zell-Oberflächen-Schnittstelle (Abbildung 2.1) zu charakterisieren (Iglic et al., 2011). Diese Art Schnittstellen existieren in leicht variierender Form ebenfalls zu verknöchertem Gewebe oder zu Implantatoberflächen bzw. zu den Oberflächen eines Bioreaktors zur Gewebszüchtung.

Wachstumsfördernde mechanische Stimulation von Osteoblasten reguliert das Knochenwachstum *in vivo* und kann, in der medizinischen Therapie eingesetzt, krankheitsbedingtem Knochenschwund

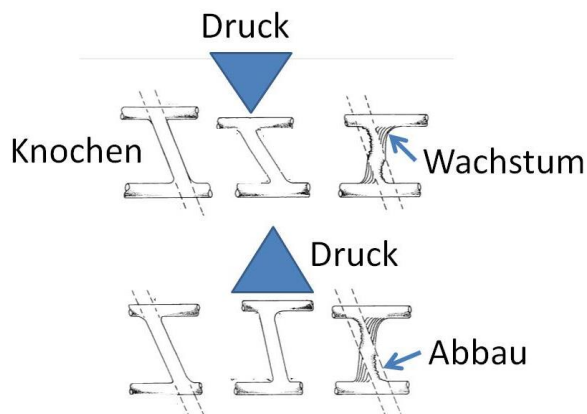


Abbildung 2.2: Frostmodell zur Regulierung des Knochenwachstums. Unabhängig vom Angriffspunkt des Druckes entstehen im Knochen lokal Regionen, in denen ein Aufbau bzw. ein Abbau von Knochen stattfindet. Herrscht an einer lokalen Stelle eine Stauchung, führt dies zu Knochenwachstum (Modifiziert nach Frost, 1990)

entgegenwirken (Brighton et al., 1996; Tanaka et al., 2003; Kim et al., 2006). Der Ansatz bei der Zellstimulation ist denkbar einfach: Frost (1990) formulierte lineare, mathematische Modelle, die eine Verstärkung des Knochens unter Last (Stimulationspuls) anhand bestimmter Faktoren erklären (Abbildung 2.2). Er beschreibt die physikalische Verformung des Knochens als Verhältnis der gestauchten Länge des Knochens zu seiner lastfreien Länge (Einheit Microstrain). Durch diese geringe Längenänderung des Knochens wird auf die knochenformenden

Zellen (Osteoblasten/Osteoklasten) ein stimulativer Reiz ausgeübt (Frost, 1990a, 1990b, 1990c, 1990d). Neben der mechanischen Stimulation im Frostschen Sinne, die in Form von alltagsbedingten Knochenbelastungen auftritt, stehen vor allem elektrische Reize im Fokus der Aufmerksamkeit. Ausgangspunkt für die Anregung der Osteogenese mit Elektrizität waren die Beobachtungen des japanischen Orthopäden Yasuda (1953) über die piezoelektrischen Eigenschaften des lebenden Knochens (Fukada and Yasuda, 1954; Edel, 1985). Knochenstimulationen im elektrischen Feld werden seit mehreren Jahrzehnten erfolgreich in der klinischen Praxis eingesetzt (Schmidt-Rohlfing et al., 2011).

Ein aktuelles Forschungsgebiet ist die Charakterisierung der Schnittstelle, die eine Übertragung stimulativer Reize ermöglicht. Diese Schnittstelle besteht aus der extrazellulären Matrix (EZM), dem jeweiligen Untergrund und der Zelle selber. Die mechanische Anbindung der Zelle auf der Oberfläche wird demnach durch die EZM vermittelt. Dabei ist die Bildung der EZM auf der Oberfläche und die anschließende Adhäsion einer Zelle eine Sukzession unterschiedlich schneller Prozesse. Bei Kontakt der Oberfläche mit einer Flüssigkeit physiologischer Ionenstärke, z.B. Blut oder Zellkulturmedium, bildet sich an der Grenzfläche unmittelbar eine sog. elektrochemische Doppelschicht aus. Sie besteht aus verschiedenen Ionentypen, die sich aufgrund der Oberflächenladung der Grenzfläche an ihr anlagern. Auch Zellen bzw. Proteine besitzen eine Oberflächenladungsverteilung mit entsprechender elektrochemischer Doppelschicht. Häufig tragen Proteine bzw. Zellen einerseits und die Oberfläche andererseits eine gleichnamige Ladung. Daraus resultiert eine repulsive Wechselwirkung, die es als

ersten Schritt einer Zellbefestigung an der Oberfläche zu überwinden gilt. Der zweite Schritt dieser adhäsiven Sukzession ist die Adsorption EZM-bildender Proteine an der Oberfläche. Diese Proteine stellen hochspezifische Bindungsstellen für Zellmembranproteine bereit (Hynes, 1987; Takeichi, 1991; Chen and Springer, 2001). Desweiteren, als letzten Schritt, adhäriert die Zelle an der so vorbereiteten Oberfläche.

Die EZM-vermittelte Zell-Oberflächenverbindung kann zahlreiche Zellantworten auslösen und somit das Verhalten der Zelle und ihr ontogenetisches Schicksal bestimmen (Yang et al., 1995; Miller and Moon, 1996; Artavanis-Tsakonas, 1999; Eliceiri and Cheresch, 1999; Jin and Varner, 2004). Die EZM vermittelt nicht nur die offensichtliche Funktion der mechanischen Verknüpfung, sondern steuert das geregelte Zellwachstum (Gospodarowicz et al., 1980; Schwartz and Assoian, 2001), den Zelltod (Lukashev and Werb, 1998) oder dient als Kanal zur Signaltransduktion in die Zelle (Geiger et al., 2001a). Die Organisation der EZM ist ein selbstregulierender Prozess, der Wechselwirkungen zwischen der Oberfläche, der EZM und der Zelle einschließt. Einerseits präsentiert die EZM mittels der Proteine Fibronectin (FN, vergl. Abbildung 2.1), Vinkulin oder Kollagen Bindungsstellen für die gewebspezifische Zelladhäsion, andererseits besitzen Zellen die Fähigkeit, die vorhandenen Gegebenheiten der EZM durch komplexe intrazelluläre Vorgänge umzugestalten. Ein prominentes Beispiel für eine derartige zelluläre Umgestaltung ist die Fibrillogenese des FN (Couchman et al., 1990; Geiger et al., 2001a). Zusätzlich beeinflussen strukturelle und chemische Oberflächeneigenschaften die EZM-organisierenden Vorgänge, die zur Zelladhäsion führen, was z.B. zu einer variierenden Proteinadsorptionsrate bei chemisch verschiedenen Oberflächen führen kann (Szleifer, 1997). Die mechanosensitiven Eigenschaften des FNs, das rheologische Verhalten integrinexprimierender Zellen und die Tatsache, dass die Zellmembran im Bereich des Oberflächenkontakts eine Reaktionsfläche zur Bildung eines Rezeptor-Liganden-Paares darstellt, gibt einen Hinweis darauf, dass es sich bei diesen mechanischen Wechselwirkungen um denjenigen Kanal handeln könnte, der *in vivo* von einem so komplexen System wie dem Knochen zur Übertragung eines globalen Stimulationspulses in die Zelle genutzt wird (Werb et al., 1989; Juliano and Haskill, 1993; Dalton et al., 1995). Anzeichen für eine tragende Rolle der die Membran durchquerenden Integrine bei der Übertragung zyklischer Stimulationspulse stützen diese These zusätzlich (Salter et al., 1997).

Die bisherigen Erkenntnisse über die mechanische Zellstimulation sind sehr unpräzise, da es schwierig ist, Zellreaktionen bestimmten Stimulationsparametern zuzuordnen (König et al., 1993; Boyan et al., 1996; Klein-Nulend et al., 1997; Rubin et al., 2001). Diese Tatsache hat in der Literatur zu einer unübersichtlichen Menge an verschiedenartigen Herangehensweisen geführt (Brown, 2000). Besonders in der medizinischen Praxis haben sich Stimulationsverfahren vor allem aus praktischen Erfahrungswerten herausgebildet (Edel, 1985). Gegenwärtig stehen zellkulturbasierte Systeme zur Stimulation von Osteoblasten im Fokus der medizinischen Forschung (Yoshikawa et al., 1997; Ozawa

et al., 1998). Dabei wachsen Zellen in einer Reaktionskammer entsprechend der oben beschriebenen Vorgängen fest. Anschließend wird durch eine Schwingung eine Reizapplikation vorgenommen. Dieser mechanische Reiz greift u.a. über die EZM an der Zelle an. Die Funktion dieser Signaltransduktionskette ist bisher vor allem zellphysiologisch beschrieben und lässt das komplexe mechanische Zusammenspiel der einzelnen Komponenten außer Acht. Das Ziel meiner Arbeit ist es, eine detaillierte Charakterisierung der Zell-Oberflächen-Schnittstelle durchzuführen. Die Erkenntnisse dienen in anschließenden Projekten als Grundlage für die Konstruktion eines Bioreaktors zur Stimulation von Osteoblasten. Die genaue Kenntnis der Mechanosensitivität der EZM-Zell-Schnittstelle sowie ihrer mechanischen Eigenschaften soll es ermöglichen, klare Randbedingungen für Stimulationsparameter festzusetzen.

Die Rastersondenmikroskopie stellt eine leistungsstarke Methode dar, die neben ihrer ursprünglichen Verwendung als bildgebendes Verfahren durch eine Kalibrierung der Rastersonde Kräfte im Bereich einiger Pikonewton (pN) bestimmen kann. In diesem Kraftbereich entfalten sich Proteine, wie sie in der EZM vorzufinden sind (Erickson, 1994; Oberhauser et al., 2002). Diese mechanische Entfaltung von Proteinen ist ein in der Natur vorkommendes Phänomen und stellt kein im Labor produziertes Artefakt dar (Fisher et al., 2000; Best et al., 2003; Carrion-Vazquez et al., 2003; Li, 2011; Yew and Paci, 2012). Beispielsweise entfaltet sich Titin, ein Protein modularen Aufbaus, das für die passive Elastizität des Muskels verantwortlich ist, exakt auf der durch experimentelle Rahmenbedingung gefundenen Reaktionskoordinate (Rief et al., 1997; Marszalek et al., 1999; Lu and Schulten, 2000; Fowler et al., 2002). Ein Vergleich mechanisch und chemisch entfalteter Proteine ist ebenfalls möglich. Verschiedene Studien zeigen, dass durch chemische Entfaltungen und durch mechanische Entfaltung dieselben Zeitkonstanten für die Öffnung der tertiärstrukturstabilisierenden Bindungen bestimmt wurden (Carrion-Vazquez et al., 1999b). Die Adhäsionsstärke von Zellen ist durch kraftspektroskopische Methoden in ähnlicher Weise ebenfalls sehr gut experimentell zugänglich (Franz and Puech, 2008). Mittels der sogenannten Single-Cell Force Spectroscopy (SCFS) werden Kräfte bestimmt, die nötig sind, Bindungen der Zelle zur Oberfläche zu lösen. Bei diesen Bindungen handelt es sich in der Regel um Salzbrücken oder Wasserstoffbrücken. Das von Bell (1978) vorausgesagte Modell für solche Bindungen unter Krafteinfluss ist experimentell mit kraftspektroskopischen Methoden bestätigt worden.

In der vorliegenden Arbeit ist die Kraftspektroskopie in drei Teilgebiete übertragen worden. Jedes Teilgebiet charakterisiert einen Aspekt der Zellbindung zu einer artifiziellen Oberfläche. Der erste Teilabschnitt befasst sich mit der unspezifischen Bindung zu solchen Grenzflächen. Der zweite Teilabschnitt charakterisiert die Entfaltung des EZM-Proteins FN in Gegenwart von Heparin. Der dritte

Teil untersucht die Zelladhäsion auf biokompatiblen Materialien. Beide Studien geben einen grundlegenden Einblick in den Aufbau und die Regulationsmechanismen der EZM.

3 Theorie

3.1 Oberflächenwechselwirkung

3.1.1 Hintergründe

Die spezifische Zelladhäsion bestimmt das Zellschicksal und ist ein entscheidender Faktor für das Entwicklungsschicksal der Zelle (Wozniak et al., 2004; Albrecht et al., 2006; Lien et al., 2006). Zelladhäsion zeigt neben diesen spezifischen Vorgängen, vor allem auf körperfremden Oberflächen (Ikai, 2008), anteilig ein Adhäsionsverhalten, das durch unspezifische Vorgänge vermittelt wird. Diese Vorgänge sind meist elektrostatischer Natur und beinhalten Aggregationsprozesse, die durch polyvalente Ionen wie Spermidin vermittelt werden. Seit 1677, als van Leeuwenhoek Kristalle in humanen Spermatozoen beschrieb, die, wie sich später herausstellte, eine erstaunlich hohe Konzentration (3.3 mg/ml) Spermidin besitzen, ist die ubiquitäre Rolle von Polyaminen wie Spermidin, Spermin oder Putrescin im Metabolismus der Zelle Gegenstand der Forschung (Khan et al., 1992). Polyamine werden entweder aus der proteinogenen Aminosäure Arginin oder aus der nichtproteinogenen Aminosäure Ornithin hergestellt. Ornithin ist eine Verbindung, die im Harnstoffzyklus vorkommt (Scalabrino and Ferioli, 1984; Tabor and Tabor, 1984). In prokaryotischen E. coli Zellen und in verschiedenen Hefen sind Polyamine ein wichtiger Faktor zum Schutz vor oxidativem Stress (Chattopadhyay et al., 2003, 2009; Eisenberg et al., 2009). Polyamine besitzen die Fähigkeit die schädigende Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies auf verschiedene zelluläre Bestandteile wie DNA zu unterdrücken (Khan et al., 1992; Ha et al., 1998; Rider et al., 2007). Die Polyaminkonzentration bei starker Zellteilung und in stark wachsendem Gewebe ist erstaunlich hoch (Russel and Snyder, 1968; Snyder et al., 1970; Kawakita and Hiramatsu, 2006). Allerdings ist noch nicht geklärt, ob diese hohe Polyaminkonzentration Folge oder Ursache einer erhöhten Stoffwechselrate in solchen Zellen ist. Nach einem molekularen, erschöpfend erklärenden Mechanismus wird weiterhin gesucht (Algranati and Goldemberg, 1977; Tabor and Tabor, 1984; Igarashi and Kashiwagi, 2000). Eine unüberschaubare Anzahl an Publikationen diskutiert die ubiquitäre Rolle der Polyamine (detailliertere Informationen unter: Igarashi et al., 1974; Sha et al., 1996; Shimogori et al., 1996; Igarashi et al., 1997; Williams, 1997; Yoshida et al., 1999; Hanfrey et al., 2011).

Es konnte gezeigt werden, dass Spermidin einen stabilisierenden Effekt auf doppelsträngige RNA während der Replikation haben kann (Cohn et al., 1978). Spermidin vermittelt die Kristallisation von tRNA und ermöglicht so hochauflösende Röntgenbeugungsbilder (Quigley et al., 1978). Bohinc et al. (2004) beschreiben die Fähigkeit von Spermidin, die gegenseitige Abstoßung gleich geladener großer unilamellarer Vesikel (GUV) aufzuheben. Diese Autoren zeigen in ihren Experimenten, dass GUVs in der Gegenwart von Spermidin spontan agglutinieren (Frank et al., 2008). Um diese Effekte zu

erklären, kann a priori nicht angenommen werden, dass der zugrundeliegende Mechanismus nur auf der spezifischen Bindung des Spermidins beruht. Variierende elektrostatische Eigenschaften zwischen Spermidin und den erwähnten Verbindungen sollten diesbezüglich ebenfalls bedacht werden.

Spermidin besitzt eine Kohlenstoffkette, die an ihren Enden jeweils eine Aminogruppe trägt. Eine andere funktionelle Gruppe, ein Imin, unterteilt die Kohlenstoffkette unsymmetrisch. Abhängig von dem vorherrschendem pH-Wert kann Spermidin dreifach protoniert sein. Kimberly und Goldstein (1981) zeigen mittels ^{13}C -NMR Spektroskopie die Protonenverteilung in Abhängigkeit vom pH-Wert. Spermidin ist bei physiologischen pH-Werten vollständig protoniert und gibt bei einer Überführung ins Basische sukzessive Protonen ab. Steigt der pH-Wert höher als 10,5, ist Spermidin vollständig deprotoniert.

Die Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek –Theorie (DLVO) beschreibt unter Einbeziehung von van der Waals-Kräften und elektrostatischen Wechselwirkungen die Anziehung zweier sich nähernder Membranen (Cowley et al., 1978; Israelachvili, 2011). Gewöhnlich ist die gegenseitige Abstoßung zweier ähnlich geladener Oberflächen, wie in unserem Fall die Membranen und eine Oberfläche, in einem Elektrolyt durch abstoßende Wirkung der elektrochemischen Doppelschicht erklärt. Sie kann nicht durch die, auf große Distanz unwirksamen aber attraktiv wirkenden van-der-Waals-Kräften überwunden werden. Trotz vieler Vereinfachungen erklärt die DLVO-Theorie das Verhalten solcher biologischer Systeme sehr gut. Allerdings enthält die Theorie nicht die beobachteten Effekte polyvalenter Ionen wie Spermidin (Kjellander et al., 1988). Aus einem elektrochemischen Blickwinkel bedeutet die durch Gegenionen vermittelte Anziehung zweier Oberflächen eine reduzierte Abstoßung der elektrochemischen Doppelschichten dieser Oberflächen (Manning, 1969; Manning and Ray, 1998; Israelachvili, 2011). Eine Schwächung des repulsiven Doppelschichteffekts kann durch die sogenannte Ionenkondensation, eine vom Ionenradius abhängige stärkere Bindungsenergie multivalenter Ionen zu geladenen Oberflächen, hervorgerufen werden. Ein weiterer Effekt der die Poisson-Boltzmann-Theorie, die abstoßenden Kräfte über die volle Distanz zwischen den beiden Oberflächen ergänzt, sind die Ionenkorrelations- bzw. Ladungsfluktationskräfte. Oosawa (1970) beschreibt Kräfte die durch eine Fluktuation der auf der geladenen Oberfläche gebundenen Gegenionen entstehen. Diese Fluktuationen führen bei kurzen Distanzen zu einer Anziehung der beiden Grenzflächen. Monte-Carlo-Simulationen stützen diese Theorie (Wennerström et al., 1982; Guldbrand et al., 1984).

3.1.2 Spermidingleichgewicht

An Hand der ermittelten Daten zeigte sich, dass die Höhe der den attraktiven Wechselwirkungen zugrundeliegende Kraft vom Protonierungsgrad des Spermidins abhängig ist. Zur Beschreibung eines pH-abhängigen Kraftanstiegs konnten aus diesem Grund die Gleichgewichte zwischen den einzelnen Protonierungsgraden herangezogen werden:



mit SP als Kürzel für das Spermidinmolekül und H^+ für die Protonen. Die Gleichgewichtslage war durch die jeweiligen Gleichgewichtskonstanten K_1 , K_2 und K_3 gegeben (Kimberly and Goldstein, 1981). Da jeder Protonierungsgrad in unterschiedlicher Weise zur Gesamtkraft F_{rel} beiträgt, gilt:

$$F_{rel} = f_1 \frac{[SP^0]}{[SP]} + f_2 \frac{[HSP^{1+}]}{[SP]} + f_3 \frac{[H_2SP^{2+}]}{[SP]} + f_4 \frac{[H_3SP^{3+}]}{[SP]} \quad \text{Gl. 3.4}$$

Die Faktoren f_1 , f_2 , f_3 und f_4 definieren den Kraftbeitrag der de-, mono-, di- und triprotonierten Spermidinspezies zur Gesamtkraft F_{rel} . Da die unter bestimmten pH-Bedingungen vorliegenden Spezieskonzentrationen messtechnisch nicht zugänglich sind, wurde Gl. 3.4 anhand der die Gleichgewichtskonstanten und über pH-Wertbestimmungen ermittelbaren Protonenkonzentrationen bestimmt.

$$F_{rel} = \frac{K_1 K_2 K_3 f_1 + K_1 K_2 f_2 [H^+] + K_1 f_3 [H^+]^2 + f_4 [H^+]^3}{K_1 K_2 K_3 + K_1 K_2 [H^+] + K_1 [H^+]^2 + [H^+]^3} \quad \text{Gl. 3.5}$$

Die Ermittlung der Funktion, die jedem beliebigen pH-Wert eine Gesamtkraft F_{rel} zuordnet, lagen einige Annahmen zugrunde. Die Annahmen wurden aufgrund theoretischer Überlegungen Mannings bzw. Oosawas und anderer Autoren zur Ionenkondensation bzw. Ionenkorrelation getroffen (Manning, 1969; Oosawa, 1970; Guldbrand et al., 1984; Manning and Ray, 1998). In Monte-Carlo-Simulationen von Ionendichteverteilungen ρ wurde beobachtet, dass die abstoßenden Kräfte der elektrochemischen Doppelschicht zwischen zwei planaren Oberflächen hoher Oberflächenladungsdichte ($< 100\text{mV}$) durch Ionen-Korrelationskräfte monovalenter Ionen (vgl. Anhang) um 10 – 15 % gesenkt werden konnten. Für divalente Ionen konnte die Abstoßung der elektrochemischen Doppelschicht durch Ionenkorrelationseffekt in einer Weise gesenkt werden, dass zwischen den Oberflächen eine attraktive

Kraft entstand (Wennerström et al., 1982). Da Spermidin ab einem pH-Wert von 10.5 mono- bzw. deprotoniert ist, wurde in Einklang mit den Messdaten und aufgrund der in der Literatur beschriebenen theoretischen Überlegungen angenommen, dass diese Spezies keinen Beitrag zur attraktiven Gesamtkraft leisten. Zur Erfüllung dieser Randbedingungen wurden die Konstanten f_1 und f_2 in Gl. 3.5 als null definiert. Dadurch ergab sich:

$$F_{rel} = \frac{[H^+]^2 (K_1 f_3 + f_4 [H^+])}{K_1 K_2 K_3 + K_1 K_2 [H^+] + K_1 [H^+]^2 + [H^+]^3} \quad \text{Gl. 3.6}$$

Diese Gleichung wurde in Abschnitt 5.1 an die gemessenen Daten angepasst.

3.2 Molekülmechanik

3.2.1 Fibronektin

FN ist ein modular aufgebautes Glykoprotein und bindet spezifisch an Integrine wie $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Hynes, 1987; Couchman et al., 1990; Aota et al., 1991; Cherny et al., 1993). Es existiert in allen Körperflüssigkeiten als lösliches Dimer und in der EZM in einer unlöslichen Form. Das dimere Molekül hat ein Molekulargewicht von 220 – 250 kDa pro Monomer (Bustanji et al., 2003). Die Tertiärstruktur der einzelnen Module ist ein mäanderartiges Motiv von β -Faltblättern (Leahy et al., 1994). FN wird in drei verschiedene Typen von Domänen unterteilt (FNI, FNII und FNIII, Lucena et al., 2007). In FNIII-Modulen fehlen die stabilisierenden Disulfidbrücken, so dass es mechanisch entfaltet werden kann. Durch diese Entfaltung wird die Affinität der RGD-Sequenz zu den RGD-bindenden Integrinen

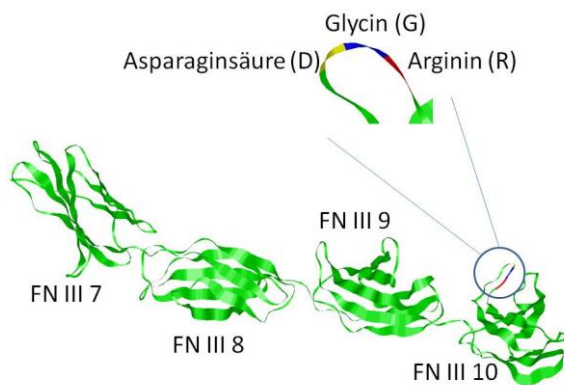


Abbildung 3.1: Fibronektin FN III₇₋₁₀. Der Ausschnitt zeigt die RGD-Bindungsstelle (PDB ID: 1FNF, Leahy et al., 1994)

erniedrigt (Krammer et al., 2002). Dieselben Autoren diskutieren außerdem einen kooperativen Mechanismus, der selektiv auf bestimmte Integrine wirkt. Diese sogenannte „Synergy Site“ liegt auf dem benachbarten FNIII₉-Modul. Die Affinität der erwähnten Integrine zur RGD-Bindungsstelle ist durch die Wirkung der Synergy Site 40fach erhöht (Grant et al., 1997). Dieser kooperative Mechanismus ist ebenfalls struktursensitiv (Krammer et al., 2002). Durch diesen Prozess steht ein molekularer

Regelmechanismus zur Zelladhäsion bereit. Außer der Lebensdauer der Adhäsionsverbindungen entsteht in manchen Zelltypen, z.B. Osteoblasten, eine physiologische Veränderung wenn mechanische Reize auf die Zellen einwirken. Diese spezifische Schnittstelle zwischen Kontaktfläche und EZM ist in die Mechanotransduktion, z.B. stimulativer, mechanischer Reize, involviert (Salter et al., 1997). Im Fall von Osteoblasten steuert die Intergrinadhäsion die Mineralisierung des angrenzenden Gewebes (Schneider et al., 2001). In SMFS-Experimenten ist die mechanische Entfaltung von Fibronektin gut charakterisiert (Krammer et al., 1999; Paci and Karplus, 1999; Oberhauser et al., 2002). Die Einflüsse auf eine derartige strukturgesteuerte, d.h. durch Entfaltung beeinflusste, Variation der Affinität eines Liganden zu seinem Rezeptor kann durch viele Faktoren beeinflusst sein. In der Literatur sind Entfaltungen durch chemische Substanzen wie Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid gut beschrieben. Besonders fluoreszenzspektroskopische Studien erwiesen sich hier als sinnvoll (Appella and Markert, 1961; Greene and Pace, 1974; Pace, 1986; Hübler et al., 1998; Qu et al., 2009). Die kraftspektroskopische Beschreibung solcher Substanzen ist bei diesen chemischen Substanzen jedoch nicht klar mit den fluoreszenzspektroskopischen Daten korreliert (Carrion-Vazquez et al., 1999a). Das

Polysaccharid Heparin zeigt ein denaturierendes Verhalten auf die Struktur von FN. Die FN-Stabilität in der Gegenwart von Heparin ist Gegenstand diesen Teils der vorgelegten Arbeit.

3.2.2 Heparin

Heparin ist ein Polysaccharid, das aus einer variablen Anzahl von Aminosacchariden besteht. Es kommt in Mastzellen von Organen wie der Leber und dem Darm vor (Khan et al., 2010). Heparin besitzt ein

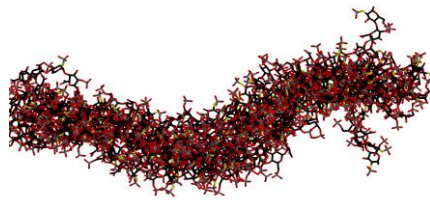


Abbildung 3.2: Heparinmolekül (PDB-ID: 3IRK, modifiziert nach Khan et al., 2010)

breites Spektrum an biologischen und physiologischen Wirkungen, wobei als prominentestes Beispiel die Wirkung zur Antikoagulation zu nennen ist (Machovich, 1975). Es besitzt antivirale Aktivität (Holodniy et al., 1991) oder steuert im Körper die Freigabe von Enzymen wie die Lipoproteinlipase (Liu et al., 1992). Durch spezifische Wechselwirkungen mit Proteinen ist es in der Lage, auf vielfältige Weise im Organismus zu wirken (Capila and

Linhardt, 2002). So besitzt FN eine Heparin-Bindungsstelle und kann eine FN-Aggregation vermitteln (Bentley et al., 1985).

3.2.3 Allgemeines zur Single-Molecule Force Spectroscopy

Die Single-Molecule Force Spectroscopy (SMFS) besitzt ein weites Anwendungsfeld. Mittels SMFS können mechanischen Eigenschaften einzelner Moleküle wie Proteine (Paci and Karplus, 1999; Fowler et al., 2002; Best et al., 2003; Ng et al., 2007), Nukleinsäuren (Strunz et al., 1999; Clausen-Schaumann

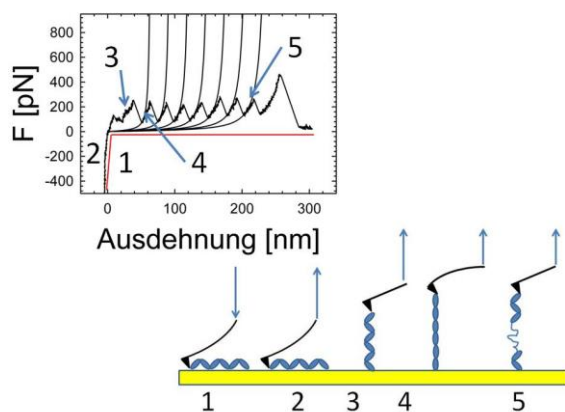


Abbildung 3.3: Ablauf eines SMFS-Experiments. 1 Proteinadsorption an der Spitze, 2 Hochziehen der Polymerkette, 3 unspezifischer Abriss von der Goldoberfläche, 4 Streckung des Proteins, 5 Entfaltung. (Modifiziert nach Rounsevell et al., 2004)

et al., 2000), Polysaccharide (Marszalek et al., 1998) und künstliche Polymere (Zou et al., 2006) bestimmt werden. Die einfachste Methode der Moleküladsorption ist das Aufnehmen eines oberflächenadhärenten Moleküls durch unspezifische Wechselwirkungen mit der Rastersonde. Zur mechanischen Molekülcharakterisierung adsorbiert ein einzelnes Molekül an einer Rastersonde. Dazu müssen die Probenträger eine gewisse Affinität für die zu bestimmenden Moleküle besitzen. Im Fall von Proteinen werden dazu häufig Goldoberflächen verwendet, da diese mit

proteineigenem Schwefel relativ starke Bindungen ausbilden. Dieser Schwefel stammt aus der Thiolgruppe des Cysteins. Erfordert das Experiment eine derartige Oberflächenadhäsion, muss vor den Messungen mittels der Primärstruktur geklärt sein, ob das Protein Cystein enthält (Rounsevell et al.,

2004; Morris et al., 2010). Abbildung 3.3 A zeigt solch einen Meßablauf. Die Rastersonde nimmt durch einen kurzen Kontakt mit der Oberfläche bei einer festgelegten Kraft ein einzelnes Molekül auf und streckt es beim Hochziehen. Durch die mechanischen Kräfte, die auf das Protein wirken, entsteht eine charakteristische Entfaltungskurve (Abbildung 3.3 B). Der Ort des unspezifischen Kontakts der Rastersonde mit dem Molekül ist zufällig. Der Kontakt mit der Rastersonde entsteht nicht zwangsläufig am Ende einer Proteinkette, sondern kann an einer beliebigen Stelle innerhalb der Molekülkette liegen. In der Kraftkurve äußert sich das durch die Anzahl der Entfaltungsereignisse (sägezahnartige Struktur in der Kraft-Abstandskurve, Abbildung 3.3 B).

3.2.4 Polymermodelle

Die einfachste Form ein Polymer zu beschreiben, ist als eine zufällige Knäuelgestalt: eine Kette von Monomereinheiten, die freie Drehbarkeit um die Intermonomerbindungen besitzen (Morris et al., 2010). Aufgrund der chemischen Struktur solcher Polymere ist es allerdings zweckmäßiger, das Molekül als einen Körper mit einer gewissen Steifigkeit zu betrachten. Diese Steifigkeit entsteht durch Einschränkungen in der Drehbarkeit um einige Bindungen des Polymers. In der Polymerphysik haben sich zur Beschreibung von Polymerketten zwei Grundtypen von Modellen durchgesetzt, die zur Anpassung an verschiedene Moleküle, z.B. DNA (Wang et al., 1997; Williams and Rouzina, 2002), einige Modifikationen erfahren haben. Das ist einerseits das von Kratky und Porod (1949) entwickelte Worm-Like-Chain-Modell (WLC-Modell) und das Freely-Jointed-Chain-Modell (FJC, Bueche, 1962; Smith et al., 1996). In der Anwendung sind beide Modelle gleichwertig; sie benutzen allerdings unterschiedliche Konzepte, um semiflexible Moleküle zu erklären. Der Unterschied in den Modellen liegt vor allem darin, dass das FJC Modell keine Korrelation der einzelnen Segmente (Monomere) der Polymerkette aufweist, es wird z.B. zur Charakterisierung des Polysaccharids Xanthan genutzt (Li et al., 1998). Die Gesamtlänge des gestreckten Polymers heißt die Konturlänge L_c . Sie setzt sich aus den Längen der einzelnen Monomere zusammen:

$$L_c = n \cdot l \quad \text{Gl. 3.7}$$

Die Gl. 3.7 enthält mit n die Anzahl der Monomere und l der Segmentlänge zwei Variablen. Das FJC beschreibt die Steifigkeit eines Polymers mit der Kuhnlänge l_K (Abbildung 3.4). Die Kuhnlänge ist eine statistische Längeneinheit, die durch flexible Verbindungen gelenkartig getrennt sind. Mit der Kuhnlänge ergibt das FJC-Modell:

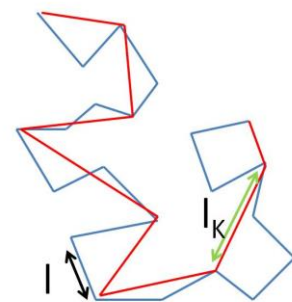


Abbildung 3.4: Die Kuhnlänge definiert die Steifigkeit im FJC-Modell.

$$z(F) = L_C \left[\coth \left(\frac{Fl_K}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{Fl_k} \right] \quad \text{Gl. 3.8}$$

Wobei L_C der Konturlänge, F die Kraft, T die absolute Temperatur und k_B die Boltzmann-Konstante ist.

$$F(z) = \frac{k_B T}{l_p} \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{z}{L_C} \right)^{-2} + \frac{z}{L_C} - \frac{1}{4} \right] \quad \text{Gl. 3.9}$$

Bei der mechanischen Entfaltung von Proteinen findet in klassischer Weise das WLC-Modell zur Beschreibung der Steifigkeit der Polymerkette Verwendung. In diesem Modell wird l_K durch die Persistenzlänge l_p ersetzt. Die Persistenzlänge erlaubt einen variablen Abstand zwischen den flexiblen Verbindungen und definiert die Steifigkeit des Polymers über diesen Abstand. Nach der Einführung der Persistenzlänge ergibt sich für das WLC-Modell:

$$F(z) = \frac{k_B T}{l_p} \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{z}{L_C} \right)^2 + \frac{z}{L_C} - \frac{1}{4} \right] \quad \text{Gl. 3.10}$$

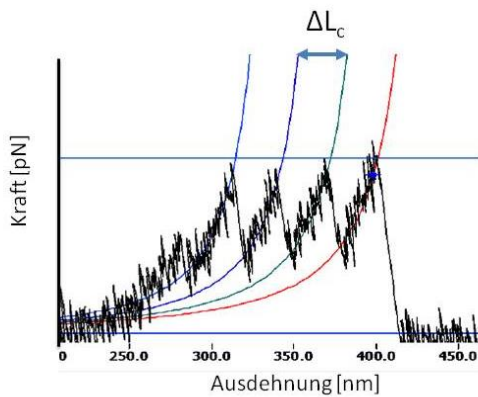


Abbildung 3.5: Kurvenanpassung zur Bestimmung der Konturlängenänderung ΔL_C . An jedes Ereignis wird eine WLC-Kurve angepasst, die Distanz zwischen ihnen beschreibt die Konturlängenänderung

Wobei L_C die Konturlänge, F die Kraft, T die absolute Temperatur und z die Ausdehnungsrichtung ist.. Abbildung 3.5 zeigt wie aus der Differenz der jeweiligen Konturlängen, d.h. der Position der Fitkurven, der Wert von ΔL_C bestimmt werden kann. Stellt man sich zwei Vektoren t_1 und t_2 vor, die an einer beliebigen Stelle des Polymers an zwei benachbarten Segmenten der flexiblen Verbindung angreifen, so kann mittels des Öffnungswinkels Θ die Steifigkeit der Polymerkette bestimmt werden.

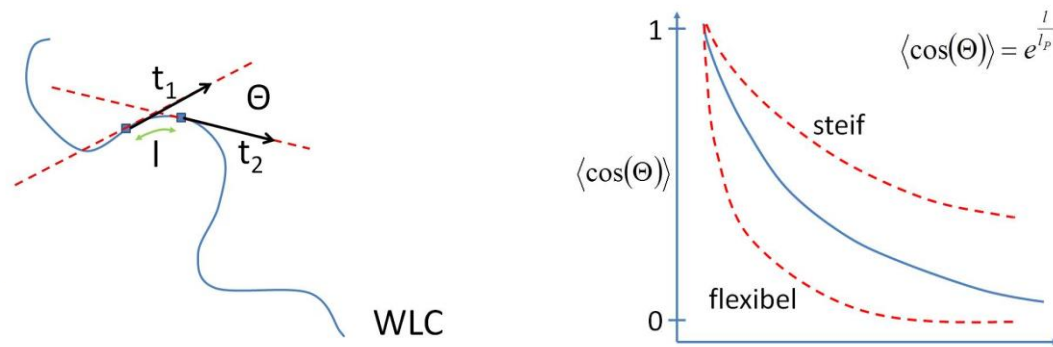


Abbildung 3.6: (A) Öffnungswinkel Θ zwischen zwei Vektoren die auf der Polymerkette an freibeweglichen Segmentgrenzen angreifen. (B) Die Steifigkeit wird im WLC-Modell durch den Öffnungswinkel definiert.

Je kürzer die Segmentlänge ist, d.h. je flexibler das Molekül, desto größer wird der Winkel Θ . Dadurch entsteht zwischen Persistenzlänge und Winkel Θ folgender Zusammenhang:

$$\langle \cos(\Theta) \rangle = \frac{1}{\exp(l/l_p)} \quad \text{Gl. 3.11}$$

Die Persistenzlänge gibt also diejenige Segmentlänge an, nach der der Öffnungswinkel Θ auf $1/e$ des Ursprungwertes abgefallen ist.

3.3 Zellmechanik

3.3.1 Fibroblastenadhäsion

L929 Fibroblasten sind ein verbreitetes Modellsystem für Biokompatibilitätstests (ISO 1992; ISO1997). Sie zeigen bei hohen Passagenzahlen eine konstante Wachstumsrate bei stabilen zellphysiologischen Parametern. Zudem und bilden sie dank ihres Integrinexpressionsmusters (Nath et al., 2000) zusammen mit FN-funktionalisierten, spitzenlosen Rastersonden ein stabiles SCFS-Messsystem (Abbildung 4.7).

Der spezifisch-molekulare Mechanismus beruht auf Reaktionen nach dem Rezeptor-Liganden-Prinzip von Membranproteinen und Proteinen der EZM. Für die Ausbildung dieser Bindung stellt die Membran einer zweidimensionalen Reaktionsfläche dar in der sich die Rezeptorproteine bedingt (Zytoskelett, interzelluläre Grenzen, u.v.m.) bewegen. Die Ausbildung dieser spezifischen Bindungen wird von zahlreichen Autoren als ein Fließgleichgewicht zwischen gebundenen und freien Reaktionspartnern beschrieben (Bell, 1978; Dembo et al., 1988; Evans and Ritchie, 1997; Zhu, 2000). Ist die Anzahl aktiver Bindungen wesentlich kleiner als die durchschnittliche Anzahl freier Rezeptoren und ihrer Liganden, kann diese Reaktion durch das einfache kinetische Zeitgesetz einer Steady-State Reaktion beschrieben werden (Hammer and Lauffenburger, 1987; Chesla et al., 1998):

$$\langle n \rangle = A_c n_r n_l \frac{k_f}{k_r} [1 - \exp(-k_r t)] \quad \text{Gl. 3.12}$$

Hierbei sind $\langle n \rangle$ die durchschnittliche Anzahl aktiver Bindungen, A_c die Kontaktfläche zwischen der Zelle und der Oberfläche, n_r und n_l die Dichten der Reaktionspartner in diesen Flächen und k_f bzw. k_r die Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- bzw. Rückreaktion. Diese Zeitkonstanten sind eminent wichtig zur Beschreibung der Zelladhäsion. Sie zeigen an, wie schnell eine Rezeptorligandenbindung zustande kommt (k_f) bzw. wie lang ihre Lebensdauer (k_r) ist, was vor allem in der ersten sehr kurzen Zeitspanne die Festigkeit einer Adhäsion bestimmt. Aus dem Quotienten in Gl. 3.12 ist ersichtlich, wie das relative Verhältnis der Konstanten zueinander die durchschnittliche Anzahl $\langle n \rangle$ an Bindungen beeinflusst. Gl. 3.12 beschreibt einen einfachen kinetischen Zusammenhang und quantifiziert die Geschwindigkeitskonstanten. Die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion steht damit im direkten Zusammenhang mit der Lebensdauer der jeweiligen Bindung bzw. der durchschnittlichen Anzahl der Bindungen nach Gl. 3.12. In Kapitel 4.1.3 ist die Kraftabhängigkeit der Lebensdauer einer solchen Bindung beschrieben. Nicht nur die Entfaltung, d.h. das Öffnen der Bindungen, der Tertiärstruktur von Proteinen und der Zerstörung ordnender Strukturen in Molekülen (z.B. Konformationen in Polysacchariden oder der Auflösung von Quatärstrukturen in Proteinen) zeigt sich eine derartige Kraftabhängigkeit, auch zelluläre Oberflächenbindungen folgen diesem Prinzip, das so von zahlreichen Autoren beschrieben ist (Bell, 1978; Evans and Ritchie, 1997; Marszalek et al., 1999; Taubenberger et al., 2007). Durch die hier gewählte Vorgehensweise einer konstanten Zuggeschwindigkeit (siehe unten) sowie die unterschiedlichen Zeitskalen einer kinetischen Reaktion dieser Ordnung und den Reaktionen der unten aufgeführten Messungen ergibt sich eine Diskussionsgrundlage die kinetische Gesichtspunkte dieser Art ausschließt. Die vorliegenden Daten stützen diese Betrachtung eines rheologischen Einflusses auf die Adhäsionsstärke der Zellen. Dabei sind die hier vorgeschlagene Verbindung von kinetischen Vorgängen zur Quantifizierung von $\langle n \rangle$ und die Bestimmung von A_c aus rheologischen Daten nicht neu, in Computersimulationen wurde ein solches Fließgleichgewicht mit elastischen und geometrischen Eigenschaften der Zelle gekoppelt (N'Dri et al., 2003). Durch unsere Arbeit konnten Daten experimentell zugänglich gemacht werden (Elter et al., 2010).

3.3.2 Charakterisierung der verwendeten Materialien

Verschieden Autoren beschreiben die Schnittstelle zwischen der Zelle und der EZM als eine Schlüsselkomponente bei der Übertragung mechanischer Reize (Salter et al., 1997; Schneider et al., 2001). Es ist zunächst nicht von größerem Belang, welcher Art das Substrat ist, das als Untergrund für diese Schnittstelle dient. Sowohl bei den in der Endoprothetik verwendeten Titanlegierungen als auch übliche Materialien in Bioreaktoren (PC; PDMS etc.) benötigen die Adsorption von EZM-Proteinen um

den Zellen eine Adhäsionsmöglichkeit zu präsentieren (Dewez et al., 1999; Stevens and George, 2005; Elter et al., 2012).

Betrachtet man zunächst den gut beschriebenen Fall von Titanoberflächen. Als Werkstoff zur Herstellung von Implantaten dient heutzutage meistens eine Titan Aluminium Vanadium bzw. Niob Legierung (Ti6Al4V oder Ti6Al7Nb, Scharnweber et al., 2002). Das Nebengruppenelement Titan gehört zu den Übergangsmetallen und zeichnet sich dementsprechend durch eine hohe Zugfestigkeit, einen niedrigen thermischen Ausdehnungskoeffizienten und durch eine hohe Biokompatibilität aus, was es für den Einsatz in der Endoprotetik ideal erscheinen lässt. Es gehört zu den Leichtmetallen und hat einen hohen Elastizitätsmodul, was sich nachteilig auf die Implantatintegration auswirken kann, da Kräfte nicht dissipativ vom Material aufgenommen werden können. Reines Titan ist silberweis und gut leitend ($10^4 \Omega^{-1}\text{m}^{-1}$). Ein klassisches Verhalten von Übergangsmetallen ist, dass sie verschiedene Oxidationszustände einnehmen können. Einer dieser Oxidationszustände (TiO_2) bildet auf der Oberfläche eine Passivierungsschicht, die äußerst stabil ist aber, da sie auf der Oberfläche des Titans liegt, die elektrochemischen Eigenschaften dieses Metalls oder seiner Legierungen beeinflusst. Diese Schicht verleiht Titan eine hohe Korrosionsbeständigkeit (Riedel, 1994). Zur Optimierung der osseointegrativen Eigenschaften eines Implantates, ohne die günstigen mechanischen Eigenschaften des Werkstoffes zu verändern, eignen sich Beschichtungen und Strukturierungen (Khang et al., 2008). Mit Nano bzw. Mikrostrukturierungen versucht man in Zelldimensionen bzw. Proteindimension vorzustoßen und die Implantatintegration auf zellulärer bzw. proteindimensionaler Ebene zu beeinflussen. Die gegenwertige Sachdiskussion fußt auf folgender Grundlage: Bei der Mikrostrukturierung werden konvexe und konkave Elemente dazu genutzt die Zelladhäsion durch eine variierendes Angebot an Adhäsionsfläche zu beeinflussen (Elter et al., 2010, 2012; Matschegewski et al., 2010), was zu einer unterschiedlichen Adhäsionsstärke während der initialen Adhäsion führt, bzw. die Zellmorphologie auf solchen Oberflächen kultivierten Zellen verändert. Eine in proteindimensionale nanostrukturierte Oberfläche nutzt die durch konvexe bzw. konkave Elemente entstehende Variation in den elektrostatischen Eigenschaften der Oberflächen, wodurch eine veränderte Proteinabsorption an der Oberfläche stattfindet, die außerdem auch die Proteinstruktur beeinflussen kann. Die wissenschaftliche Literatur diskutiert diesen Sachverhalt äußerst intensiv. Es ist nicht nur unsicher ob die veränderte Proteinadsorption neben geometrischen Oberflächenvariationen auch elektrostatische Eigenschaften hat, die durch eine Variation der Geometrie beeinflusst sind (Elter et al., 2011; Iglic et al., 2011; Kabaso et al., 2011). Bei der hier vorgelegten Studie dienten mir Untersuchungen auf Titanoberflächen als Referenz für die Charakterisierung der Zelladhäsionseigenschaften auf solchen Materialien die in Bioreaktoren zur Gewebszüchtung Anwendung finden.

Zu diesen Materialien gehört Glas, das den laboralltäglichen Vorteil besitzt, wegen seiner Transparenz gut mikroskopierbar zu sein. Glas ist eine amorphe unterkühlte Schmelze, die vor allem aus Siliziumoxid besteht, was Glas über einem weiten pH-Bereich eine negative Oberflächenladung verleiht. Als Folge der optischen Durchsichtigkeit besitzt Glas eine sehr glatte Oberfläche. Während des Fertigungsprozesses können die physikalischen Eigenschaften von Glas durch Zugabe bestimmter Substanzen (Bortrioxid, Arsensulfid oder Aluminiumoxid), stark variieren. Das in dieser Studie eingesetzte Borosilikatglas ist ein sehr chemikalien- und temperaturbeständiges Glas. Es besitzt wie Titan einen geringen Wärmeausdehnungskoeffizienten ($\approx 3.3 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$), wodurch seine Temperaturbeständigkeit bedingt ist. Glas diente als idealer Untergrund zur Oberflächenmodifikation. Durch das gezielte Aufbringen von Hydroxylapatitstrukturen konnte die Fibronektinadsorptionsrate und damit die Zelladhäsion verbessert werden und werden als ideales Trägermaterial für derartige Oberflächen in Bioreaktoren zum Tissue Engineering diskutiert (García et al., 1998).

Polystyrol ist wie Glas für den Einsatz in Bioreaktoren als grundlegendes Substrat von Interesse, da es biokompatibel und nicht zytotoxisch ist. Es findet vor allem in der Zellkultur Anwendung und ist Hauptmaterial für die Produktion von Zellkulturschalen. Festes, amorphes Polystyrol besitzt optische Durchsichtigkeit und damit mikroskopierbar, es ist hart und schlagempfindlich. Polystyrol ist beständig gegen wässrige Laugen und Mineralsäuren, jedoch nicht gegen unpolare Lösungsmittel sowie längerkettigen Ketonen und Aldehyden. Es besitzt einen relativ geringen Schmelzpunkt (55°C), was ein Autoklavieren unmöglich macht. Produkte aus Polystyrol sind in der Zellkultur aus diesem Grund nicht wiederholt einsetzbar. Polystyrol lässt sich chemisch leicht modifizieren, was eine Beeinflussung der Bioaktivität im positiven Sinne ermöglicht, was durch verschiedene Adhäsionsstudien nachzuweisen ist (Curtis et al., 1983). Ein ähnlicher Sachverhalt gilt für Kunststoffe wie Polycarbonat und PDMS. Auch sie sind günstig in ihrer Anschaffung, besitzen optische Durchsichtigkeit, lassen eine leichte chemische Oberflächenmodifikation zu und die Variationen der physikalischen Eigenschaften gegenüber Polystyrol sind für die Biokompatibilität nicht entscheidend (Leclerc et al., 2003; Price et al., 2003; Fuard et al., 2008).

Platin wird in mikrofluidischen Systemen und in Bioreaktoren zur Herstellung von Sensoren zur Bestimmung von Zellparametern (pH, O₂, Wachstumsrate; Koester et al., 2010; Buehler et al., 2011) verwendet. Platin ist ein sehr dehnbares Edelmetall und sehr korrosionsbeständig, was es zu einem idealen Material für die Schnittstelle zwischen elektrischem System und physiologischer Lösung macht. Einerseits ist Platin edelmetalltypisch chemisch träge, andererseits katalytisch selektiv gegenüber bestimmten Substanzen und Reaktionsbedingungen. Hohe Schmelzpunkte, chemische Resistenz und gute katalytische Eigenschaften bestimmen die technische Anwendung dieses Edelmetalls. Platin wird

zur Herstellung von Laborgeräten (Tiegel, Elektroden), für Widerstandsdrähte und Thermoelemente benutzt (Riedel, 1994)

3.3.3 Integrine

Die Grundlage für eine spezifische Zelladhäsion bilden Matrixproteine, die nach dem sogenannten Schlüssel-Schloss Prinzip spezifische Bindung mit genau definierten Reaktionspartnern eingehen können. Diese Transmembranproteine heißen Integrine. Integrine sind Zelloberflächen Rezeptoren die nicht ausschließlich zur Zelladhäsion dienen. Sie vermitteln Zellaggregationen, Zellmigrationen oder sie vermitteln beispielsweise Leukozytenadhäsion (Hynes, 1987). Strukturell haben Integrine einen gemeinsamen Aufbau. Sie bestehen jeweils aus einer α und β Untereinheit. Beide Untereinheiten existieren in verschiedenen Variationen, deren Kombination eine hohe Spezifität bei einer hohen Anzahl an Rezeptormolekülen gewährleistet. In Integrinen ist, wenn sie vorhanden ist, die α I Domäne die Hauptbindungsstelle für Adhäsionsfaktoren. Sie enthält die sogenannte MIDAS (Metal Ion Dependent Adhesion Site), die ein koordinativ gebundenes Mg^{2+} Ion im aktiven Zentrum enthält. Dieses Metallion kann koordinativ 3 weitere Bindungen mit negativ geladenen Aminosäureresten eines anderen Proteins eingehen (Xiong et al., 2002). Abbildung 3.7 zeigt beispielhaft eine α I Domäne an die ein ICAM (Intercellular Adhesion Molecule) gebunden ist. Die spezifische Bindung an extrazelluläre Matrix Proteine wie Fibronectin ist meist komplexer. Fibronectin enthält in seiner Primärstruktur eine RGD-Tripeptidesequenz (R = Arginin, G = Glycin, D = Asparaginsäure). Diese Struktur trägt pH abhängig durch drei stickstoffenthaltenden funktionellen Gruppen des Arginins eine positive und durch die Carboxylgruppe der Asparaginsäure eine negative Ladung. Diese Struktur bindet an der extrazellulären, oberen Schnittstelle zwischen der α und β Untereinheiten. Dabei geht das Tripeptide mit der negativ geladenen Carboxylgruppe eine koordinative Bindung mit einer MIDAS auf der β Untereinheit ein, wobei die die Argininseitenkette eine Bindung mit einem Aminosäurerest einer in der Primärstruktur der α Untereinheit verankerten Asparaginsäure eingeht (Xiong et al., 2002; Luo et al., 2007).

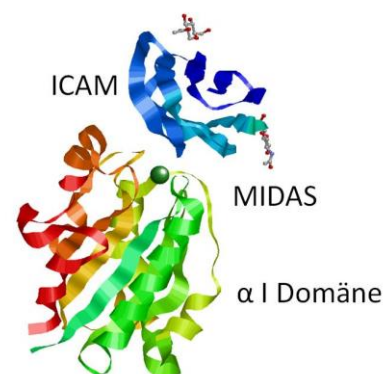


Abbildung 3.7: Integrin α I Domäne mit ICAM an der spezifischen MIDAS. (PDB ID 1TOP(7))

Proteine der Extrazellulären Matrix (EZM) tragen mit der Variation ihrer Bindungsstellen zur Spezifität der Zelladhäsion bei. Kollagene, Laminin, Vitronektin, Fibronektin oder andere Glykoproteine sind

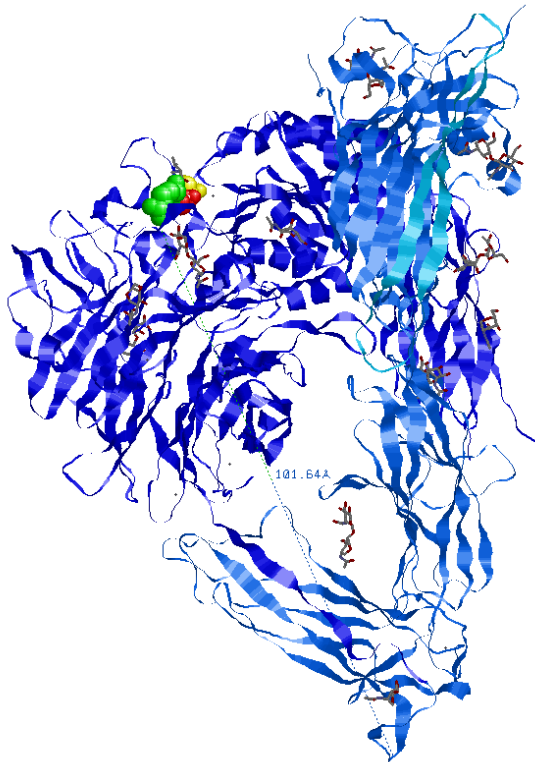


Abbildung 3.8: Integrin mit gebundener RGD Fibronektinbindungsstelle (PDB ID: 1L5G, modifiziert nach Xiong et al., 2002)

Proteine, die als Bindungsstelle für Integrine dienen. Dabei besitzen verschiedene Proteine unterschiedliche Bindungsstellen, z.B. ist die Bindungsstelle für das dimere $\alpha_2\beta_1$ Integrin ein Tetrapeptid mit der Sequenz Asp-Gly-Glu-Ala (DGEA) (Staat et al., 1991). Die Spezifität dieser Bindungen beschränkt sich nicht nur auf die Rezeptor-Liganden-Bindung, auch die Kombination verschiedener Integrinuntereinheiten befähigt die Zelle zu einer spezifischen Adhäsion (Hynes, 1987; Ruoslahti, 1991; Humphries et al., 2006). Verschiedene Zelltypen exprimieren verschiedene Integrine und adhären damit substratspezifisch (Ezzell et al., 1997; Benoit et al., 2000; Liu et al., 2000). Durch das sogenannte „Homing“, ist es möglich innerhalb eines Organismus Gewebe zu organisieren aber auch die Metastasenbildung beim invasiven Wachstum eines Karzinoms besitzt

hier seine Gründe. Brutskarzinome können im Knochen metastasieren, da sie die entsprechenden Integrine exprimieren können (Cheresh et al., 1989; Evans, 1992; Shaw et al., 1997). Das in dieser Arbeit verwendete Fibronektin besitzt eine spezifische RGD Bindungsstelle für das Integrin $\alpha_5\beta_1$ (Takagi et al., 2003). Dieses Dimer wird von Fibroblasten, den Modelzellen dieser Arbeit, exprimiert.

3.3.4 Zytomechanik

Zellen besitzen viskoelastische Eigenschaften (Marszalek et al., 1989; Poznanski et al., 1992; Wu et al., 1998; Elter et al., 2010). Um diese Materialeigenschaften zu quantifizieren wird in den hier präsentierten Messungen das Kelvin-Voigt-Modell zur Beschreibung der gemessenen Daten herangezogen (für die genaue Beschreibung siehe Anhang). Jedoch kann aufgrund des apparativen Aufbaus des Rastersondenmikroskops nur eine Charakterisierung der mechanischen Zelleigenschaften unter einer uniaxialen Belastung erfolgen.

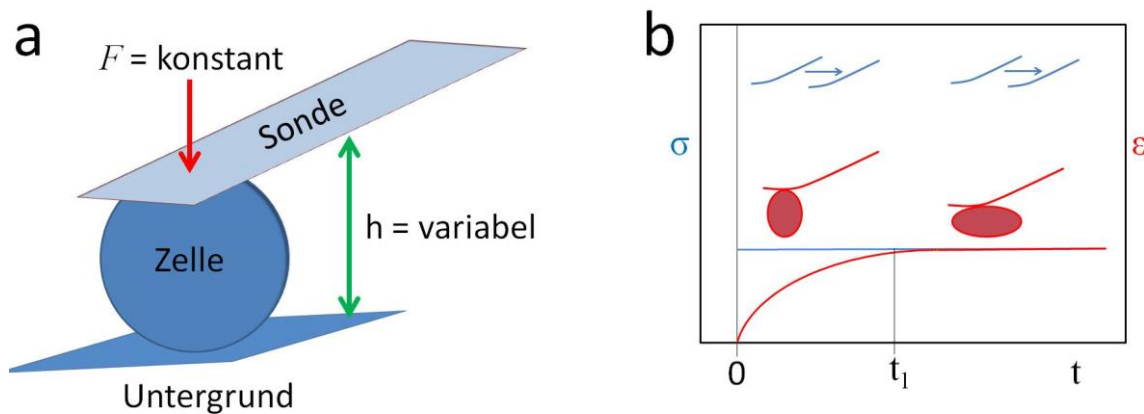


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung zur Anwendung des Kelvin-Maxwell-Modells während der SCFS-Messungen. (a) Schematische Darstellung einer SCFS-Messung während eines Experiments mit konstanter Kraft, d.h. die Höhe ist variabel. Da die Zelle eine vertikale Relaxation zeigt lässt sich das Kelvin-Voigt Modell zur Erklärung heranziehen. (b) Zeigt den Kurvenverlauf der vertikalen Relaxation einer Zelle (rot, ϵ) und die konstante Kraft (blau, σ). Da diese Modelle der klassischen Mechanik entstammen, wurden die Bezeichnung σ für Spannung [Pa] und ϵ für die Dehnung [Δm] benutzt (siehe Anhang). Die Diagrammen in (b) repräsentieren die jeweilige vertikale Relaxation der Zelle (rot) und die konstante Spannung der Rastersonde (blau).

Abbildung 3.9 zeigt die Oberflächenannäherung einer sondenadhärenten Zelle während eines SCFS – Experiments mit einer regelkreisgesteuerten konstanten Kraft F (Constant Force). In diesen isotonischen SCFS – Experiment kann das Zellverhalten mit einem viskoelastischen Modell beschrieben werden. Bedingt durch die konstante Kraftwirkung auf die Zelle (Abbildung 3.9), kann zur theoretischen Beschreibung das Kelvin – Voigt – Modell mit einer unendlichen Kriechphase herangezogen werden (siehe Anhang). Der in der Modelldefinition (siehe Anhang) geforderte konstante Enddehnungswert, d.h. eine endlichen Auslenkung bzw. Stauchung des Ersatzschaltbildes, bedeutet wegen $\dot{\epsilon} = 0$ (für eine konstante Dehnungswerte) einen geringeren Spannungswert, der niedriger ist als das anfängliche σ_0 . Da über den Regelkreis des Rastersondenmikroskops eine konstante, isotonen Spannung auf die Zelloberfläche (vgl. siehe Anhang und Abbildung 3.9) ausgeübt wird, ergibt sich die unendliche Kriechphase, was einer Stauchung der Zelle ins unendliche gleichkommt. Die Stauchung ϵ der Zelle nähert sich als Funktion der Zeit (siehe Anhang) jedoch asymptotisch einem Maximalwert an, d.h. es existiert ein endlicher Grenzwert für die Dehnung bzw. Stauchung der Zelle und eine gewisse Zellhöhe wird auch im Kelvin – Voigt – Modell zu keinem Zeitpunkt überschritten bzw. unterschritten. Ein Vorteil der isotonen Spannung, die auch konstant auf die Rastersonde wirkt, ist, dass zu keinem Zeitpunkt der Messung eine elastische Relaxation der Rastersonde in den theoretischen Erläuterungen Beachtung finden muss.

Bei isometrischen SCFS-Messungen, d.h. die Rastersonde befindet sich auf konstanter Höhe und übt auf die Zelloberfläche eine abnehmende Spannung aus, versagt das Kelvin-Voigt-Modell. Solange die konstante Höhe kleiner als die Zellhöhe ist (abgesehen von einem kleinen zusätzlichen Spannungsbetrag, der durch den Anstellwinkel der Rastersonde zustande kommt) wirkt auf die

Zelloberfläche über die Rastersonde eine abnehmende Kraft. Zur theoretischen Erklärung sollte ein modifiziertes Maxwell – Modell herangezogen werden. Allerdings ergibt sich für den Experimentator im Messverlauf ein Bild, das durch die Änderung der Sondenspannung während des Experiments elastische und/oder viskoelastische Merkmale des Zellsystems mit denen der elastischen Relaxation der Sonde in unbekannter Relation zueinander vereint. Diese Tatsache muss dem Anwender bewusst sein und sowohl die Spannung σ und die Dehnung bzw. Stauchung ϵ der Zelle als zeitabhängige Funktionen müssen diesbezüglich differenziert betrachtet werden. Dies ist ebenfalls bei genauer Kenntnis der Federkonstante der Sonde der Fall, da diese von der Masse der Sonde abhängt und sich dementsprechend nach Adhäsion der Zelle am Anfang des Experiments ändert.

Zur Ergänzung des von Poznanski et al (1992) vorgeschlagene Modell (Kelvin-Voigt-Modell mit vorgeschalteter Feder) wurde zur verfeinerten theoretischen Beschreibung des elastischen Anteils des Modells (Feder) das komplexere Herz – Modell verwendet. Für eine sphärische Geometrie liefert die hertzische Pressung eine Kontaktfläche mit dem jeweiligen Untergrund, dessen Größe maßgeblich die Adhäsionsstärke, also die Stärke der Verbindung der Zelle mit der Oberfläche, bestimmt. Die Adhäsionskraft der Zelle während der initialen Adhäsion ist demnach eine Funktion der Kontaktfläche, dessen Größe aus den hertzischen Modellvorstellungen hergeleitet werden kann (siehe Anhang). Dintwa und Kollegen konnten zusätzlich zeigen, dass Hertz' Modell auch gilt, wenn seiner Theorie zugrundeliegende Annahmen, wie eine homogene und isotrope Beschaffenheit des Materials der Körper, missachtet werden (Dintwa et al., 2008). Die Zellmembran, obwohl eine zweidimensionale Flüssigkeit, entspricht als äußere Begrenzung adhärenter Zellen durch ihre Zusammensetzung (Lipide, Transmembran- und membranständige Proteine verschiedener Funktion und andere die mechanischen Membraneigenschaften beeinflussende Verbindungen) solch einer heterogenen Verbindung (Dai and Sheetz, 1997).

4 Material und Methoden

4.1 Rastersondenmikroskopie (AFM)

4.1.1 Allgemein

Die Rastersondenmikroskopie (engl.: Atomic Force Microscopy, AFM) ist seit ihrer Entwicklung Anfang der 1980er Jahre in den IBM Laboratorien durch Binnig und Rohrer (1983) und deren Entwicklung des Rastertunnelmikroskops in zahlreichen Variationen in der gegenwärtigen Forschung vorzufinden (Binnig and Rohrer, 1983). Die Rastermikroskopie hat in den unterschiedlichen Erscheinungsformen dabei ein grundlegendes Prinzip: Über eine Sonde werden unterschiedliche Wechselwirkungen mit der Probe, dies können ein Tunnelstrom (Scanning Tunneling Microscopy, STM), eine Kraft (Atomic Force Microscopy, AFM, (Binnig et al., 1986), oder ein Potentialverlauf (Kelvin Probe Force Microscopy, KPFM oder Scanning Electrochemical Microscopy, SECM) sein, die benutzerdefiniert auf einen festen Sollwert eingestellt werden, der entweder nicht über- oder unterschritten werden darf. Während der Rastervorgänge über einer Probe ergeben sich ortsabhängige Variationen dieser Messgröße, die relativ zum Sollwert über einen Regelkreis eine Störgröße generieren, die zur Oberflächencharakterisierung genutzt wird. Neben der Bestimmung topographischer Veränderungen existieren kraftspektroskopische Methoden. Zur Kalibrierung der Sonde muss zunächst deren Sensitivität gemessen werden. Dies geschieht durch einen Fit an den repulsiven Teil der Kraft-Abstands-Kurve. Der Rastersonde, als Blattfeder, wird über das thermische Rauschen eine Federkonstante zugeordnet (Hutter and Bechhoefer, 1993) und ihre Sensitivität über die Steigung des repulsiven Teils einer gemessenen Kraft-Abstandskurve bestimmt. Diese Kalibrierung ermöglicht es aus der Federkonstanten und durch die Weginformation aus der Sondenverbiegung mit Hilfe des Hooke'schen Gesetzes das optische Hebelwerk zu bestimmen (Müller et al., 2009).

4.1.2 Imaging

Die ursprüngliche Verwendung der Rasterkraftmikroskopie ist, wie der Name nahelegt, die Nutzung dieser regelkreisbasierten Technik als bildgebendes Verfahren (Binnig et al., 1986). Das Gerät fährt mit der Messspitze der Rastersonde oder im Laborjargon „Cantilever“ genannt, eine Probenoberfläche in xy-Richtung ab. Die Rasterung der ortsabhängigen Änderung der Topographie entlang der z-Achse wird über ein Laser-Hebelarmsystem über eine Fotodiode als Spannung ausgelesen und in eine Höheninformation übersetzt. Durch die im xy-Rastervorgang gewonnene Ortsinformation und die durch Falschfarben dargestellte Höheninformation erhält man eine mikroskopische Aufnahme mit einem dreidimensionalen Informationsgehalt. Dabei sind zur Bildgewinnung zwei verschiedene Verfahren üblich:

- Rasterung mit einer konstanten Höhe der Rastersonde (Constant Height): Der Abstand der Messspitze und der Probe wird während des Rastervorgangs über topographische Veränderungen nicht nachgeregelt. Die jeweilige Auslenkung der Rastersonde ergibt über eine Kalibrierung die Höheninformation, deren Wert für die Bilderzeugung im Computer ortsabhängig umgesetzt wird. Der Vorteil dieser Methode ist, dass durch Umgehung des Regelkreises sehr schnelle Bildfolgen erzeugt werden können. Diese Methode eignet sich allerdings nur für sehr flache Oberflächen, da bei zu großer Auslenkung der Rastersonde ein Bruch erfolgen könnte.
- Rasterung mit einer konstanten Kraft (Constant Force): Bei dieser Rastermethode sorgt ein Regelkreis dafür, dass während des Rastervorgangs über die topographischen Veränderungen eine konstante Kraft auf die Rastersonde einwirkt. Dies wird dadurch erreicht, dass durch einen Piezokristall die Rastersonde höhenvariiert wird. Zur Bilderzeugung wird die von der Regelung ausgegebene Piezospaltung als Höheninformation ausgewertet. Mit diesem Verfahren können auch Proben mit größeren topographischen Unterschieden vermessen werden. Dafür wird aber das Abbilden (Rastervorgang) durch das ständige Nachregeln verlangsamt.

Außer diesen Methoden, die dadurch charakterisiert sind, dass ein ständiger Spitzen-Probenkontakt herrscht, existieren noch sogenannte non-contact Methoden. Hier wird die Rastersonde in eine Schwingung mit konstanter Amplitude versetzt. Beim Rastern über die topographischen Veränderungen wird über den erwähnten Piezokristall in z-Richtung nachgeregelt, so dass die Rastersonde ihre Schwingung mit konstanter Amplitude ausführt. Zur Bilderzeugung wird wiederum die ausgegebene Piezospaltung als Signal genutzt. Der große Vorteil dieser Methode ist, dass durch den eingeschränkten Proben-Spitzenkontakt empfindliche Proben gemessen werden können

4.1.3 Dynamische Kraftmessungen

Das Öffnen geschlossener Bindungen, egal welcher Art, ist ein statistischer Prozess, in dem der gebundene und der ungebundene Zustand in einem Gleichgewicht existieren (Bell, 1978; Morris et al., 2010). Attraktive Wechselwirkungen zwischen zwei Teilchen, die energetisch höher anzusiedeln sind als die thermische Energie ($k_B T$), ergeben eine interatomare Bindung. Je nach Höhe der Bindungsenergien haben chemische Bindungen eine gewisse Lebensdauer τ_0 . Diese Aussage ist gleichbedeutend mit der Tatsache, dass sich die Bindungen auch ohne das Einwirken einer spezifischen Kraft (d.h. kT = Kraftwirkung) öffnen können. Dieser Prozess geschieht auf sehr langen Zeitskalen. Für diese Gleichgewichtsreaktionen bestehen demnach Geschwindigkeitskonstanten, die die Bildung einer

Verbindung (k_{on}) bzw. das Öffnen (k_{off}) einer Bindung charakterisieren. Dabei wird die charakteristische Lebensdauer einer Bindung durch

$$\tau_0 = \frac{1}{k_{\text{off}}} \quad \text{Gl. 4.1}$$

beschrieben. Wobei τ die Lebensdauer und k_{off} die Dissoziationsrate ist. Wenn eine Bindung in einem Zeitraum, der kleiner als ihre Lebensdauer ist, geöffnet werden soll, muss zur Überwindung der

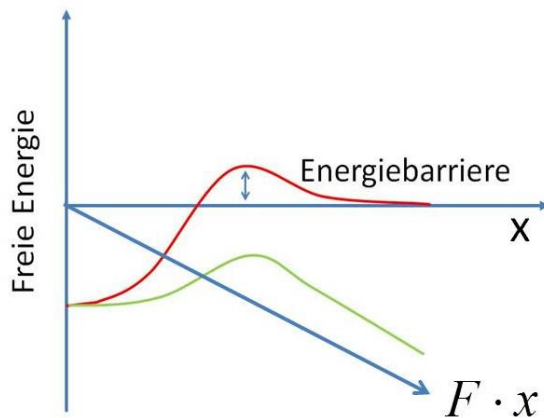


Abbildung 4.1: Erniedrigung der Energiebarriere durch Krafteinwirkung. Der blaue Pfeil stellt die entlang der Reaktionskoordinate angreifende Kraft F da (vgl. Gl. 4.2)

Energiebarriere ein bestimmter Energiebetrag aufgewendet werden (Abbildung 4.1). Das ist genau die Situation die in kraftspektroskopischen Experimenten vorliegt. Die Kraft als Messwert eines kraftspektroskopischen Experiments, die zu einer Bindungsöffnung benötigt wird, ist demnach kein einzelner Wert, sondern von der Zeit, in der diese Bindung geöffnet werden soll abhängig: Je kürzer der Zeitraum ist, in dem die Bindung geöffnet werden soll, desto mehr Kraft wird benötigt. Das Öffnen einer Bindung ist folglich eine Frage dessen,

wie viel Kraft pro Zeiteinheit auf die Bindung wirkt. Es existiert eine Rate $r = df/dt$. Dieser Kraftaufwand ist eine statistische Verteilung und kann durch:

$$\tau(f) = \tau(0) \exp \left[-\frac{Fx}{k_B T} \right] \quad \text{Gl. 4.2}$$

vorausgesagt werden. Dabei ist f die Kraft, T die absolute Temperatur, k_B die Boltzmann-Konstante, x der zurückgelegte Weg und τ die Lebenszeit. Durch den Term $F \cdot x$ ist erkenntlich, dass die Höhe der zu überwindenden Energiebarriere kraftabhängig ist (Bell, 1978; Evans and Ritchie, 1997; Kienberger et al., 2006).

4.2 Material und Methoden: Spermidin

4.2.1 Elektrophorese

Durch elektrophoretische Charakterisierung wurde geprüft, welche Oberflächenladung Borosilikat in den untersuchten pH-Bereichen trug. Die Methode ist in der Literatur gut beschrieben und wurde vielseitig eingesetzt (Donath and Gingell, 1983; Donath and Voigt, 1986; Gimsa and Gimsa, 1997). Zur Bestimmung der Oberflächenladung der Glaskugeln wurde ihre elektrophoretische Beweglichkeit bestimmt. Zur Charakterisierung der elektrophoretischen Beweglichkeit wurden Borosilikatkugeln benutzt, die zu den kraftspektroskopischen Messungen vergleichbar waren (Polyscience Inc., Eppelheim, Deutschland). Die Messungen fanden in einem konstanten elektrischen Feld (2 kV m^{-1}) statt. Die gewünschte Feldstärke wurde durch eine Regelung des Stroms an einer Konstantstromquelle erreicht (250 mA, Carl-Zeiss Metz, Deutschland). Die elektrophoretische Beweglichkeit u wurde anhand der Gleichung $u = v/E$ bestimmt, wobei v die Kugelgeschwindigkeit und E die elektrische Feldstärke war. Sämtliche Messungen wurden in der stationären Ebene durchgeführt. Die Messungen fanden in einem am Lehrstuhl modifizierten Zellelektrophoresesystem (Parmoquant 2 Mikroskop, Carl-Zeiss Jena, Deutschland) statt. Die Geschwindigkeiten der Glaskugeln wurden handgestoppt (Stoppuhr, TFA-Dostmann, Wertheim, Deutschland). Die Leitfähigkeiten der verwendeten Lösungen wurden mit einem Konduktometer bestimmt (inoLab, WTW, Weilheim, Deutschland). Die Viskosität der Lösungen wurde mit einem Viskosimeter bestimmt (VEB MLW, Prüfgeräte-Werk, Medingen, Deutschland). Es wurde 1 g des Glaskugelpulvers (Polyscience Inc., Eppelheim, Deutschland) in 50 ml deionisiertem Analysenwasser gelöst.

4.2.2 Kraftspektroskopie

Kraftspektroskopie eignet sich zur Charakterisierung der attraktiven Wechselwirkungen, die zwei



Abbildung 4.2: Funktionalisierte Silicium-Nitrid Rastersonde. Pyrex Nitride Probes mit Borosilikatkugel.

negativ geladene Oberflächen in der Gegenwart von Spermidin erfahren (zur genauen theoretischen Beschreibung dieses Phänomens siehe Anhang). Als negativ geladenen Oberflächen fiel die Wahl auf Borosilikatglas und Muskovit. Die Charakterisierung dieses Systems wurde mittels einer funktionalisierten Rastersonde durchgeführt. Abbildung 4.2 zeigt eine Rastersonde, an deren vorderem Bereich eine Borosilikatkugel befestigt wurde. Die SCFS-Messungen wurden mit einem für biologische Experimente spezialisiertem Rasterkraftmikroskop (Nanowizard II, JPK Instruments, Berlin, Germany) gemessen. Die Versuche wurden unter

Standardbedingungen durchgeführt, Geräte zur Bereitstellung zellphysiologischer Umgebungen wurden nicht verwendet. Der durch die linearisierte Piezokeramik bereitgestellte Messbereich betrug in z-Richtung 15 μm .

Zur Funktionalisierung der Rastersonden wurden 100 μm lange, balkenartige Silizium-Nitrid-Sonden verwendet (Pyrex Nitride Probes, NanoWorld; Neuchâtel, Schweiz). Die Rastersonden hatten eine nominelle Federkonstante von 0.48 N/m. Die Borosilikatkugeln (Durchmesser gaußverteilt um 10 μm , Polyscience Inc., Eppelheim, Deutschland) wurden in sterilfiltriertem Analysenwasser gelöst. Die Lösung wurde auf einen Objektträger pipettiert und die Flüssigkeit mit einem Stück Filterpapier abgezogen. An einem anderen Ende desselben Objektträgers wurde ein langsam trocknendes Epoxidharz (Uhu Plus Endfest 300, Uhu, Bühl, Deutschland) aufgetragen. Mit der Spitze der Rastersonde wurde wenig Kleber aufgenommen, abgestrichen und anschließend über eine Borosilikatkugel gefahren. Unter Ausnutzung des Regelkreises wurde mit der kleberbehafteten Rastersondenspitze eine Glaskugel aufgenommen. Die auf diese Weise funktionalisierten Rastersonden wurden 1 Stunde zum Vortrocknen im Messgerät belassen und anschließend zur Haupttrocknung mindestens 24 h in einer Box zur Rastersondenlagerung aufbewahrt. Sämtliche funktionalisierte Rastersonden wurden lichtmikroskopisch auf eine, den Äquator der Kugel nicht überschreitende, Klebenaht überprüft.

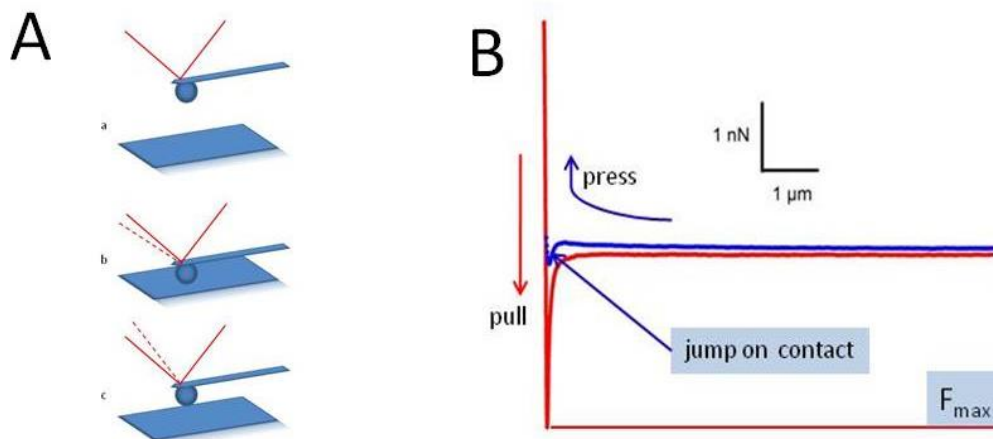


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Messebaus. (A) Ablauf der Messung. (a) Ruhelage, (b) Kurzzeitkontakt mit der Borosilikatoberfläche <1 s (c) Zurückziehen (B) Kraft-Abstands-Kurve für spermidinhaltige Lösungen.

Die Messungen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0.01 mg/ml – 0.10 mg/ml) und unterschiedlichen pH-Werten (7.00, 7.80, 9.00, 10.50 und 12.00) durchgeführt. Bei jedem dieser pH-Werte lag ein anderer Protonierungsgrad des Spermidins vor (in derselben Reihenfolge wie die pH-Werte: +3, +3, +2, +1, 0). Zur Bestimmung der durchschnittlichen Borosilikatkugel-Glimmer-Wechselwirkung wurden 1000 Kraft- Abstands-Kurven für jede Konzentration bei jedem pH-Wert

durchgeführt. Jede Messung wurde bei einem bestimmten pH-Wert in einer Konzentrationsreihe aufsteigender Ordnung beginnend mit der jeweiligen Kontrolle gemessen. Zum Austausch der Lösungen in der AFM-Messzelle wurden Spritzen (B. Braun, Melsungen, Deutschland), Kanülen (B. Braun, Melsungen, Deutschland) und Teflonschläuche (msscientific Chromatographie-Handel GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. Um in die Messzelle die nächst höhere Konzentration einzubringen, wurde mit 10 ml dieser Konzentration die Messzelle gewaschen. Anschließend verblieben während der gesamten Messung 3 ml der Lösung in der Messzelle.

Abbildung 4.3 zeigt den schematischen Ablauf der Aufnahme einer Kraft-Abstands-Kurve. Während der Messung näherte sich die Rastersonde der Oberfläche und wurde anschließend wieder zurückgezogen. Dabei wurde die mit einer Borosilikatkugel funktionalisierte Rastersonde (Abbildung 4.3 A) bis zu einer bestimmten Kraft (1.5 nN) auf die Muskovitoberfläche gepresst und nach kurzer Verweildauer (< 1 s) wieder zurückgezogen. Dies geschah, um eine zeitabhängige Konzentrationserhöhung an der Borosilikatkugeloberfläche zu vermeiden. Die Kalibrierung, d.h. die Bestimmung der Federkonstante der Rastersonde ermöglichte es, ihr die Kraft zuzuordnen, die zum Zurückziehen der Rastersonde benötigt wurde. Bei einer erhöhten attraktiven Wechselwirkung zwischen der Muskovitoberfläche und der Borosilikatoberfläche erhöht sich analog die Kraft (F_{Max} , Abbildung 4.3 C), die zum Zurückziehen benötigt wurde. Die Rastersonde wurde mit einer Geschwindigkeit von 20 $\mu\text{m/s}$ zurückgezogen. Jeder Messzyklus bestand aus 1000 Kraft-Abstands-Messungen. Die Borosilikatkugeln waren unterschiedlicher Größe, die gaußverteilt um einen Durchschnittsdurchmesser von 10 μm lag. Um eine Unabhängigkeit von der Größenverteilung zu erlangen, wurden die in den Kraft-Abstands-Messungen bestimmten Kräfte mit dem Radius der kreisrunden Kontaktfläche eines sphärischen Indenters bestimmt (Mesarovic and Fleck, 1999).

$$F = \frac{1}{1-\nu^2} \left[\frac{a^2 + R^2}{2} \ln \frac{R+a}{R-a} - aR \right] \quad \text{Gl. 4.3}$$

Wobei F die in den Messungen bestimmte Kraft, ν ($\nu = 0.5$) die Poissonzahl, R der Radius der Borosilikatkugel und a der Radius der Kontaktfläche ist.

4.2.3 Aufbau des Modellsystems

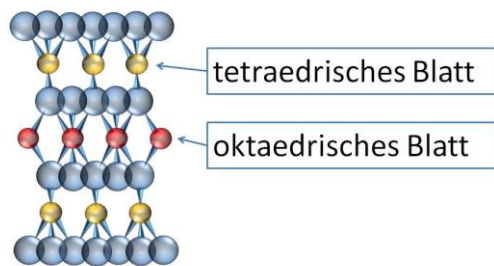


Abbildung 4.4: Aufbau eines Muskovitschichtblattes. Gelb: Silizium, Rot Aluminium, Blau: Sauerstoff

Muskovit ist ein 2:1 Glimmer bzw. Alumosilikat der allgemeinen Formel $\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})\text{OH}_2$, das aus einem oktaedrischen und aus zwei tetraedischen Blättern aufgebaut ist (Abbildung 4.4.). Die elementaren Bausteine dieser Blätter bestehen einerseits aus einem Aluminiumatom, das oktaedrisch 6 Sauerstoffatome koordinativ gebunden hat und aus einem Siliziumatom, das tetraedisch 4 Sauerstoffatome koordinativ bindet. Die Ladungen der Bausteine sind weitgehend

neutralisiert und die abschließenden Sauerstoffatome weisen nahezu keine Bindungswerten auf, wodurch zwischen den Schichten nur leichte ionische Bindungen möglich sind, was die ausgezeichnete Spaltbarkeit von Glimmer bedingt (Riedel, 1994). Die Kombination der elementaren Baugruppen erzeugt auf der Oberfläche eine Nettoladung von -1 pro Einheit, welche durch ein Kaliumion neutralisiert wird (Riedel, 1994; Zhang et al., 2009). Bei der Überführung von Muskovit in wässrige Lösungen dissoziieren diese Ionen von der Oberfläche. Dieser Vorgang erhöht den osmotischen Druck zwischen den einzelnen Schichten, wodurch das Muskovit im Verlauf der Messungen zu quellen beginnt (Israelachvili, 2011). Die Oberflächenladungsdichte ist analytisch mittels der Grahame-Gleichung (vgl. Anhang) bei einem Oberflächenpotential von 100 mV bestimmt worden und betrug $7.119 \times 10^{-2} \text{ C/cm}^2$ (Israelachvili and Adams, 1978; Pashley, 1981).

4.2.4 Spermidin

Das Polyamin Spermidin (Abbildung 4.5) zeigt im Gegensatz zu Muskovit und Borosilikatglas in dem gemessenen pH-Bereich eine hohe pH-Anhängigkeit und ein einzelnes Spermidinmolekül kann in seinem Protonierungsgrad der einzelnen Stickstoffgruppen zwischen +3 bei pH-Werten <7.8 und 0 bei pH-Werten >10.5 variieren (Kimberly and Goldstein, 1981). Abbildung 4.5 zeigt die asymmetrische Natur und die protonierbaren Stickstoffgruppen der Verbindung. Im Ensemble ist der Protonierungsgrad eine Verteilungsfunktion und ergibt sich unter Standardbedingungen aus dem Massenwirkungsgesetz. Zusätzlich ist diese Verteilung nicht nur pH-abhängig sondern zeigt in ^{13}C -NMR Messungen auch eine Variation, die von der Position der Stickstoffgruppe innerhalb der Molekülkette

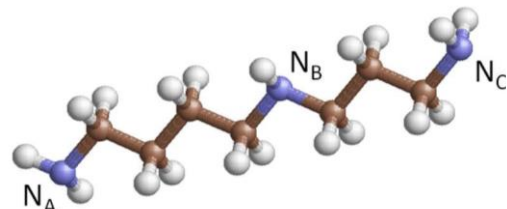


Abbildung 4.5: Struktur von unprotoniertem Spermidin. Mit braun für Kohlenstoff, weiß für Wasserstoff und violett für Stickstoff.

abhängig ist. Im Falle eines monoprotonierten Spermidins (pH 10.5) ist die Aminogruppe N_A am Ende des Propylrestes 43 % der Zeit einer in den NMR Messungen erfassten Zeiteinheit protoniert, während die von den Kohlenstoffketten flankierte Iminogruppe N_B und die am Butanylrest befindliche Aminogruppe N_C 32 % der Zeit protoniert ist. Für Gleichgewichtsreaktionen an denen ein zweifach protoniertes Spermidin beteiligt ist, ist N_A 86 % der Zeit protoniert und N_B und N_C 42 % der Zeit. Unter physiologischen Bedingungen (≈ 7.5) ist Spermidin triprotoniert. Bei diesem pH-Wert ist N_A 92 % der Zeit protoniert, N_B ist 95 % der Zeit protoniert während N_C 94 % der Zeit protoniert ist (Kimberly and Goldstein, 1981).

Die Stammlösung für die Verdünnungsreihen hatte eine Konzentration von 1 mg/ml Spermidin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Der pH-Wert nach dem Ansetzen der Lösung betrug 5.90 ± 0.05 . Da sämtliche Messungen bei höheren pH-Werten durchgeführt wurden (pH 7.00, 7.80, 9.00, 10.50 und 12.00), wurde eine Einstellung des pH-Wertes mittels Natriumhydroxid (0.1 N NaOH, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Die Menge des benötigten Natriumhydroxids wurde mittels eines Kurvenfits aus Titrationsdaten (0.1 N NaOH gegen eine Spermidinlösung in der Konzentration der Stammlösung) errechnet. Als Kontrolle wurde vor jeder Messung deionisiertes Analysenwasser desselben pH-Werts gemessen. Am Ende jeder Messsitzung wurden die pH-Werte sämtlicher Konzentrationen und der Kontrolle geprüft.

4.3 Material und Methoden: spezifische Bindung

Die SMFS findet bei der Charakterisierung mechanischer Eigenschaften verschiedener Biopolymere wie Proteine, DNA bzw. RNA oder Polysaccharide Anwendung (zur Beschreibung siehe Kapitel 3.2).

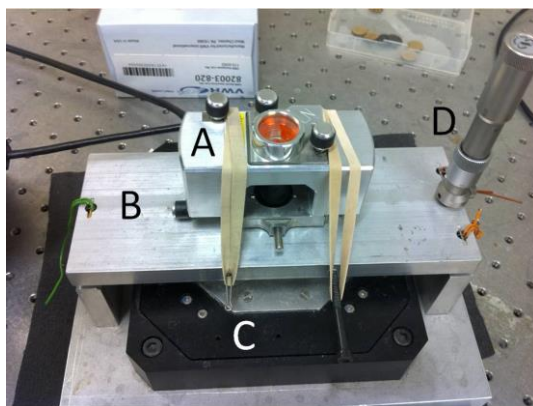


Abbildung 4.6: AFM-Aufbau zur Proteinentfaltung. A: Messkopf, B: Messbühne, C: Piezokeramik, D: Millimeterschraube zur Probenannäherung (Prof. Dr. Marszalek, Duke University, Durham, NC, USA).

Durch kurzzeitigen Kontakt mit dem Probenträger wird in vielen Zufallsexperimenten ein Polymer aufgenommen und gestreckt. Die dadurch bestimmten Kraft- Abstands-Kurven zeigen, in Abhängigkeit vom Polymer, ein bestimmtes Muster, aus dem auf mechanische und kinetische Parameter geschlossen werden kann (Evans and Ritchie, 1997; Rief et al., 1997; Dietz and Rief, 2006). Die grundlegende Theorie und eine genauere Erläuterung der Interpretation der in diesen Experimenten gewonnenen Kraft-Abstands-Kurven ist in Kapitel 3.2 beschrieben.

Die SMFS-Experimente wurden mit einem in der Gruppe von Prof. Piotr Marszalek selbstgebauten, auf die Bestimmung mechanischer und kinetischer Eigenschaften optimierten Gerät durchgeführt

(Abbildung 4.6, Duke University, NC, USA). Die Rastersonde und das optische Hebelwerk befanden sich in einem kommerziell erhältlichen AFM Kopf (Abbildung 4.6 A, Veeco Instruments Inc., Plainview, NY, USA), der auf einer selbstgebauten Vorrichtung fixiert war (Abbildung 4.6 B). Unter dieser Vorrichtung war die linearisierte Piezokeramik (Abbildung 4.6 C, Physik-Instrumente (PI) GmbH, Karlsruhe, Deutschland) zur Nanopositionierung in z-Richtung angebracht. Das Annähern der Rastersonde an die Probenoberfläche wurde mittels einer Millimeterschraube durchgeführt (Abbildung 4.6 D). Die Steuerung der Piezokeramik und die Aufnahme der Kraft-Abstands-Kurve erfolgten über ein Programm, das in einer graphischen Programmierumgebung implementiert wurde (LabView, National Instruments Co., Austin, TX, USA).

Da FN Schwefelreste in der Primärsequenz bereitstellt, eignete sich eine Goldoberfläche zur Probenpräparation. Zur Herstellung des Probenträgers wurden Glasobjektträger (Jena Bioscience, Jena, Deutschland) von organischen Resten gereinigt (Peroxomonoschwefelsäure, Fisher Scientific, Miami, FL, USA). Anschließend wurden die gereinigten Objektträger mit einer Goldoberfläche besputtert (Duke University, NC, USA). Die Probenträger lagerten bis zu ihrer Verwendung in einem Exsikkator unter Vakuum.

Zur Messung wurde eine FN-Lösung (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) von 50 µg/ml (50 pM) verwendet. Es wurden 50 µl der Probe auf den Träger gebracht und 30 min für die Proteinadsorption gewartet. Unmittelbar vor der Messung wurde ein Waschschrift mit 50 µl PBS (Fisher Scientific, Miami, FL, USA) durchgeführt. Der Probenträger wurde zur Messungen mit einem weiteren Tropfen PBS überzogen. Nach einer einstündigen Messung erfolgte eine 15 minütige Inkubation derselben Probe mit einer vorbereiteten Heparinlösung. Die Konzentration der Heparinlösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) betrug ebenfalls 50 µg/ml (50 µM). Die Messung wurde mit einer sauberen Rastersonde durchgeführt (MLCT, 0.05 N/m Federkonstante, Veeco Instruments, Plainview, NY, USA). Die Kalibrierung der Rastersonde fand nach der in Kapitel 4.1 beschriebenen Methode statt. Um etwaigen Variationen in der Kraftmessung durch unterschiedliche Rastersonden vorzubeugen, wurde jede Messsitzung (Messungen auf Oberflächen mit adsorbiertem FN und Oberflächen mit adsorbiertem FN in Gegenwart von Heparin) mit derselben Rastersonde durchgeführt. Die Auswertung ergab für heparinfreie Lösungen 177 aus den Kraft- Abstands-Kurven bestimmte Ereignisse. 208 Ereignisse konnten in heparinhaltigen Lösungen bestimmt werden. Während der Messung wurde darauf geachtet, dass nicht in mehr als 10% der Fälle Bindungsereignisse in den Kraft- Abstands-Kurven beobachtet wurden. So wurde mittels Poissonstatistik gewährleistet, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 95\%$ die Entfaltung einzelner Proteine beobachtet wurden (Carrion-Vazquez et al., 2000; Rounsevell et al., 2004) BB.

4.4 Zellkultur

4.4.1 Anzuchtbedingungen

Die murinen L929 wurden in 5 ml D10-Medium in Zellkulturschalen (TPP, Trasadingen, Schweiz) im Brutschrank (ThermoScientific, Braunschweig, Deutschland) bei einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C angezogen. Die Zellen wurden jeden dritten Tag passagiert. Vor dem Zellablösen mit Trypsin EDTA (Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) fand ein Waschschrift mit PBS statt. Anschließend wurden die Zellen in einer Zellzahl von 250.000 in einer frischen Zellkulturschale ausgesät.

Als vorbereitenden Schritt für die SCFS-Experimente wurden L929 Zellen in niedriger Zellzahl einen Tag vor den Messungen (2000/Kulturschale) in gerätespezifische Zellkulturschalen (TPP, Trasadingen, Schweiz) mit einem Durchmesser von 40 mm überführt. Die Zellen wurden bis unmittelbar vor den Messungen in ihrem Anzuchtmedium (D10) kultiviert. Vor den SCFS-Messungen wurden die Zellen in einer Accutase™ (PAA, Pasching, Deutschland) inkubiert und anschließend in serumfreies Medium überführt. Sämtliche Oberflächen unterschiedlicher Materialien wurden vor den Messungen in Lösungen (Kälberserum) inkubiert.

4.4.2 Kulturmedien und Messmedien

Das Aussaatmedium für die murinen L929 Fibroblasten besteht aus 88% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (F0435 DMEM, Biochrome AG, Berlin, Deutschland) mit Phenolrotindikator, 10% fötalem Rinderserum (FBS, Biochrome AG, Berlin, Deutschland), 1% einer Penizillin- (100 U/ml) bzw. Streptomycin- (100 µg/ml) Lösung (Biochrome AG, Berlin, Deutschland) und 1% einer L-Glutaminlösung (200 mM, Whittaker Bioproducts, Los Angeles CA, USA). Dieses Medium wurde außerdem zur Funktionalisierung der Oberflächen benutzt.

Das Medium, das während der SCFS-Messungen verwendet wurde, musste in zwei Punkten an die Versuchsvoraussetzungen angepasst werden: Es musste serumfrei angesetzt werden um sicherzustellen, dass während der Messungen keine weitere Proteinadhäsion auf den gemessenen Oberflächen stattfand und es wurde ein CO₂ unabhängiges Medium verwendet um die SCFS-Messung nicht unter den eingangs erwähnten Standardanzuchtbedingungen zu messen. Das Arbeitsmedium für die kraftspektroskopischen Zelleexperimente bestand aus 98% DMEM (F 0435, Biochrome AG, Berlin, Deutschland) mit Phenolrotindikator, 1% einer Penizillin- (100 U/ml) bzw. Streptomycin- (100 µg/ml) Lösung (Biochrome AG, Berlin, Deutschland) und 1% einer L-Glutaminlösung (200 mM, Whittaker Bioproducts, Los Angeles CA, USA). Zur Erlangung einer CO₂ Unabhängigkeit wurden 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazieethanesulfat Säure (HEPES) hinzugefügt.

Sämtliche zur Reinigung messrelevanter Gegenstände verwendeten Lösungen (Ethanol, Aceton, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) waren vom analytischen Grad.

4.4.3 Single-Cell Force Spectroscopy

Die SCFS zeichnet sich dadurch aus, dass rheologische und Adhäsionseigenschaften einzelner Zellen bestimmt werden können. Bei der Anwendung dieser Art der Kraftspektroskopie adhäriert eine Zelle am vorderen, unteren Abschnitt einer meist spitzenlosen Rastersonde (Franz and Puech, 2008; Helenius et al., 2008). Eine Funktionalisierung ermöglicht eine spezifische Verbindung zwischen der Zelle und einer Rastersonde (Abbildung 4.7 c). Diese Funktionalisierung gelingt durch die Inkubation der Rastersonde in einer Lösung, die das EZM Protein FN enthält. Eine eher unspezifische Funktionalisierung der Rastersondenoberfläche kann ebenfalls durch andere Proteine wie z.B. Concanavalin A oder BD Cell-Tak™ (BD Biosciences, 354240) erreicht werden (Ulrich et al., 2005; Puech et al., 2006; Franz et al., 2007; Taubenberger et al., 2007; Fierro et al., 2008; Krieg et al., 2008; Tulla et al., 2008; Müller et al., 2009). Antikörperfunktionalisierungen ermöglichen hingegen eine sehr hohe Spezifität für Zellkörper-Rastersondenwechselwirkung (Kang et al., 2006).

Die Bestimmung der Abrisskraft, die benötigt wird, um Wechselwirkungen der Zelle mit der Oberfläche zu überwinden, wird mittels der kalibrierten Rastersonde mit Piconewtongenauigkeit (pN) bestimmt (Butt, 1994). Außer der maximalen Abrisskraft zeigen die in den SCFS-Experimenten gewonnenen Kraft- Abstands-Kurven ein typisches Muster (Abbildung 4.7a). Allgemein zeigen solche Kurven zwei

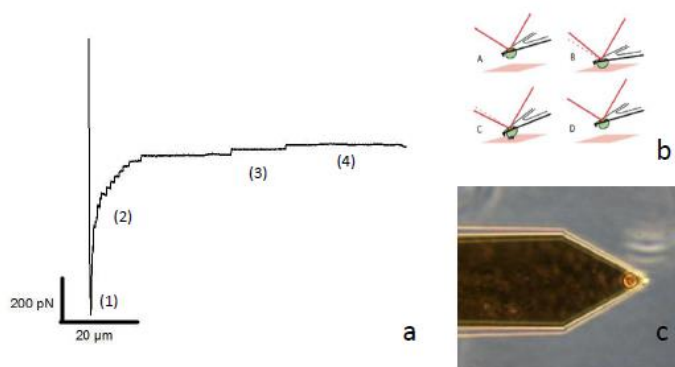


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der Abläufe während einer SCFS-Messung. a: Kraft-Abstands-Kurve (retract) (1) max. Adhäsion mit unspezifischem Anteil; b: Ablauf der Messung, (A) Ruhelage, (B) Oberflächenkontakt, (C) Zurückziehen der Rastersonde und Aufnahme der Kurve in a (modifiziert nach Puech et al., 2005), (D) erneutes Erreichen der Ruhelage; c: Rastersonde mit adhärierter Zelle.

verschiedene Arten von Bindungsereignissen, die entweder als „J“ oder als „T“ bezeichnet werden. Dabei zeigen J-Ereignisse in einer sägezahnförmigen Kurve einen kontinuierlichen Kraftanstieg bis zu dem Punkt, an dem die Verbindung zur Oberfläche reißt und der Cantilever bis zu einem gewissen Punkt zurückschnellt. Diese Art von Ereignissen wird als das lastbedingte Öffnen einzelner

diskreter Membran- und/oder Proteinbindungen zur Oberfläche angesehen, die eine kovalente Bindung mit dem Zytoskelett vorweisen. Im Gegensatz dazu findet während T-Ereignissen keine Lastzunahme (konstante Kraft) vor dem Reißen der Bindung statt. Diese Bindungsereignisse werden auf sogenannte Membrantether, d.h. Verlängerungen der Membran beim Hochziehen der Rastersonde, zurückgeführt (Raucher and Sheetz, 1999).

Die SCFS-Experimente wurden mit einem Nanowizard II AFM (JPK Instruments, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Das AFM war mit einem invertierten Lichtmikroskop (Axiovert 200, Jena, Deutschland) zur mikroskopischen Beobachtung der Zellen kombiniert. Der AFM-Messaufbau wurde mit einem speziellen Gerät zur Messbereichsvergrößerung (z-Richtung: 100 μm , CellHesion, JPK Instruments, Berlin, Deutschland) ergänzt. Die Petrischalen, als zellbeheimatender Bestandteil der Messzelle, wurden in einem Miniinkubator (PetriDishHeater, JPK Instruments, Berlin, Deutschland; TPP 93040 Petrischalen, Trasadingen, Schweiz) platziert. Hierdurch wurde eine Messung bei 37°C ermöglicht. Die Messzelle wurde während der Messung mittels einer Silikonscheibe verschlossen.

Jede Messung wurde mit einer in hochreinem 70 % Ethanol gereinigten Rastersonde (Arrow-TL1, 0.03 N/m Federkonstante, NanoWorld, Neuchâtel, Schweiz) durchgeführt. Abschließend wurde zur Entfernung etwaiger Ethanolreste ein weiterer Waschschrift in Analysenwasser durchgeführt. Eine für Fibroblastenintegrine spezifische Funktionalisierung (Tapley et al., 1989) wurde durch eine 30 minütige Inkubation der Rastersonde in einer FN-Lösung (25 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) vor jeder Messung erreicht. Die FN-Stammlösung wurde mit PBS verdünnt (Inhaltsstoffe PBS: siehe Kapitel 4.4). Um die vertikale Ablenkung des optischen Hebelarms zu bestimmen, wurde eine Kalibrierung sämtlicher Rastersonden nach der in Abschnitt 4.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Aufgrund eines besseren Signal-Rauschverhältnisses wurde im Frequenzspektrum die zweite Eigenfrequenz mit einem Korrekturfaktor von 0.251 zur Bestimmung der Federkonstante herangezogen (Butt and Jaschke, 1999). Alle auf diese Art bestimmten Federkonstanten lagen in einer schmalen Verteilung um die Herstellerspezifikation.

Die in Kapitel 4.4.1 beschriebene Behandlung der murinen Fibroblasten fand unmittelbar vor jeder Messung statt. Die Adhäsion der Zelle an die Rastersonde wurde durch einen Druck von 500pN auf die Zelloberfläche initiiert. Nach einer zehnssekündigen Wartezeit wurde die Rastersonde zurückgezogen (Retract) und anschließend eine 30 min Pause zur festeren Adhäsion der Zelle an die Rastersonde eingelegt. Eine Bewegung der Zelle entlang der Rastersonde wurde während der Messungen anhand lichtmikroskopischer Bilder ausgeschlossen. Da die Rastersonde mit einem Anstellwinkel von 10° auf die Oberfläche trifft, könnte eine Wanderung der Zelle zu hinteren Bereichen der Rastersonde die Kraftmessungen beeinflussen. Um geometrische Änderungen der Zelle während der Messungen auszuschließen, wurde zwischen den jeweiligen Schritten den Zellen eine Ruhephase von 3 Minuten eingeräumt. Die Messungen fanden unter Kulturbedingungen in CO₂-unabhängigem DMEM statt (vergl. Kapitel 4.4.2).

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Charakterisierung der Zell-Oberflächen-Schnittstelle: unspezifische Bindung

5.1.1 Elektrophoretische Bestimmung der Oberflächenladungsdichte

Mittels Elektrophorese wurde die Oberflächenladungsdichte σ der Borosilikatkugeln bestimmt. Eine Bestimmung der Oberflächenladungsdichte von Muskovit wurde nicht durchgeführt, da hier auf Literaturdaten zurückgegriffen werden konnte (Israelachvili and Adams, 1978; Lyons et al., 1981; Nishimura et al., 1992; Hartley et al., 1997). Die elektrophoretische Beweglichkeit der Borosilikatkugeln wurde in der Gegenwart unterschiedlich konzentrierter Natriumchloridlösungen (NaCl) und unterschiedlicher pH-Werte gemessen (Abbildung 5.1). Aufgrund der hohen Standardabweichungen waren die Werte für verschiedene pHs nie signifikant unterschiedlich (ANOVA, $P = 0.97$). Die Werte für unterschiedliche Salzkonzentrationen zeigten ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied (ANOVA, $P = 0.55$).

Konzentration NaCl [mM]	Oberflächenladungsdichte e [C/cm ²] pH 7	Oberflächenladungsdichte e [C/cm ²] pH 7.8	Oberflächenladungsdichte e [C/cm ²] pH 10.5
30	0.021 ±0.015	0.027 ±0.003	0.021 ±0.003
50	0.023±0.005	0.019 ±0.008	0.020 ±0.006
70	0.022 ±0.007	0.021 ±0.010	0.022 ±0.013
100	0.023 ±0.015	0.022 ±0.024	0.021±0.024
150	0.019 ±0.095	0.013 ±0.327	0.026 ±0.059

Tabelle 5-1: In elektrophoretischen Messungen bestimmte Oberflächenladungsdichte in unterschiedlichen NaCl-Lösungen bei unterschiedlichen pH-Werten (MW und SA).

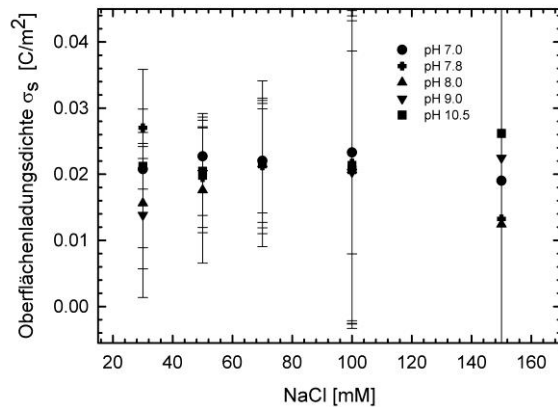


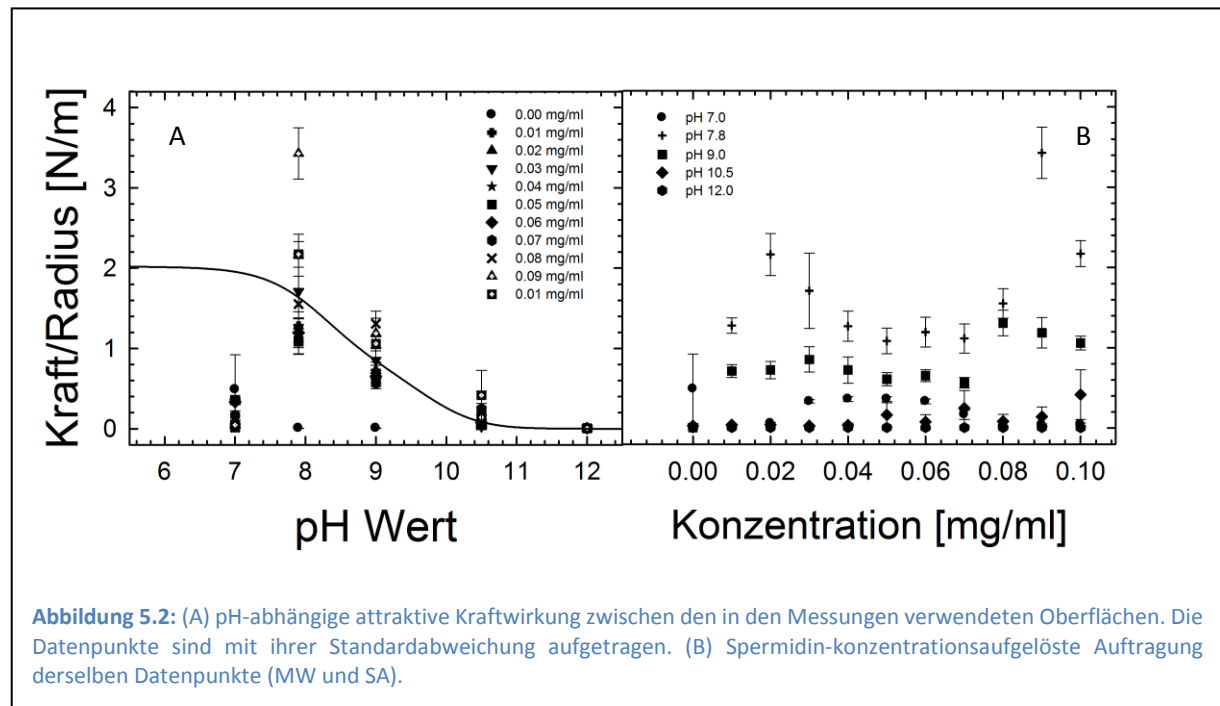
Abbildung 5.1: Oberflächenladungsdichte der Borosilikatbeads. Elektrophoretische Messungen in unterschiedlich molaren NaCl-Lösungen für variierende pH-Werte (MW und SA).

den elektrophoretischen Experimenten ergaben sich nach einer Extrapolation des Graphen in Abbildung 5.1 bis zum Schnittpunkt mit der y-Achse für ionenfreie Lösungen fast unveränderte Werte.

5.1.2 pH-Abhängigkeit der spermidinvermittelten Attraktion

Für die Messungen bei pH-Werten von 7.8 und 9.0 (Abbildung 5.3 C und D), waren in spermidinfreien Lösungen keine attraktiven Wechselwirkungen zu beobachten. Die Zugabe von Spermidin ergab (vgl. Abbildung 5.2 B) eine Attraktion der Oberflächen. Diese Attraktion zeigte eine starke pH-Abhängigkeit, d.h. die Attraktionsstärke reagierte auf den Protonierungsgrad. War bei pH 7.8 eine maximale Attraktion von 3.43 N/m ($\pm 0.32 \text{ N/m}$) zu beobachten, lag die maximale Attraktion für pH 9.0 bei 1.31 N/m ($\pm 0.16 \text{ N/m}$). Die für die Fit benutzte Titrationskurve besitzt einen Verlauf, der beim Übergang zu alkalischen pH-Werten einem sigmoiden Abfall zeigt. Durch die Anpassung des Kurvenverlaufs an die Daten erhält man die attraktive Kraft F_{rel} als Funktion des pH-Werts (Abbildung 5.2 A). Durch diesen Fit wurden für die Konstante f_3 (diprotoniert) ein Wert von $0.80 (\pm 0.18 \text{ N} \cdot \text{l} / \text{m} \cdot \text{mol})$ und für f_4 (triprotoniert) ein Wert von $2.02 (\pm 0.19 \text{ N} \cdot \text{l} / \text{m} \cdot \text{mol})$ ermittelt, d.h. der Kraftbeitrag von dreifach protoniertem Spermidin war um den Faktor 2.5 gegenüber diprotoniertem Spermidin erhöht. Das Bestimmtheitsmaß betrug $R^2 = 0.77$.

Die Borosilikatkugeln zeigten über einen weiten pH-Bereich ($> \text{pH } 7$) eine konstante Oberflächenladungsdichte. Aus den Messungen wurde mittels Elektrophorese ein Oberflächenpotential von ca. 200 mV ermittelt. Die elektrophoretisch ermittelten Daten sind leicht widersprüchlich zu Literaturdaten, die einen Umschlagpunkt des Oberflächenpotentials von negativ zu positiv bei pH 7 in ionenfreien Lösungen beobachteten (Haramé et al., 1987). Aus

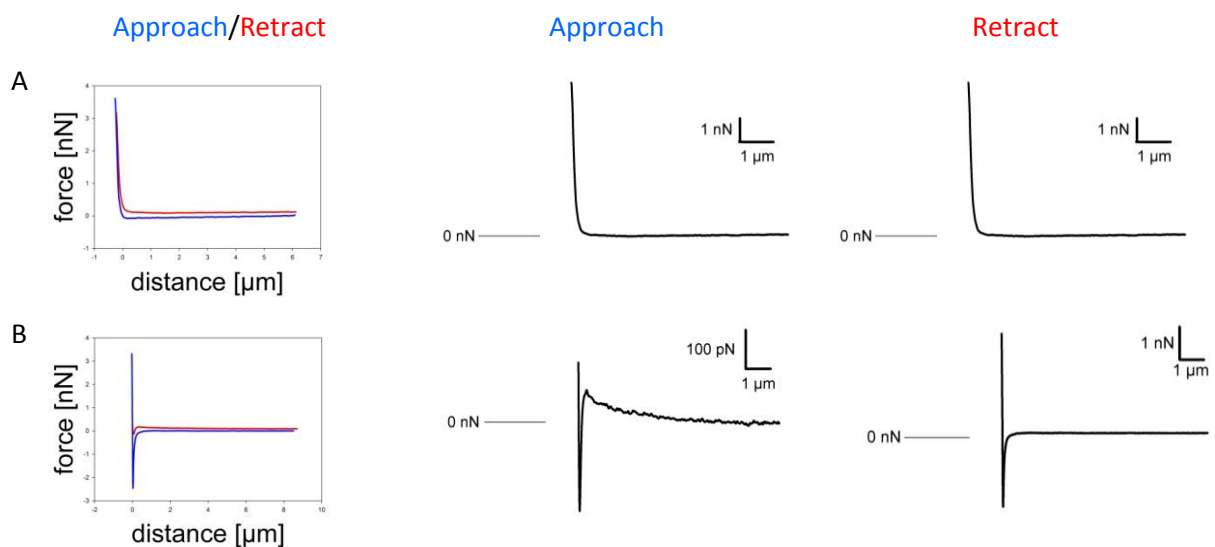


Für sämtliche basischen Lösungen wurde eine spermidininduzierte Attraktion festgestellt. Sie war abhängig vom Protonierungsgrad des Spermidins und kann durch Ionenkorrelationskräfte und Ionkondensationskräfte erklärt werden (Manning, 1969; Oosawa, 1970). Ein Zusammenspiel dieser Kräfte ist abhängig von der Ionenvalenz, der Oberflächenladungsdichte, der Debye-Länge und dem Ionenradius und führt bei polyvalenten Ionen zu einer attraktiven Anziehungskraft (Israelachvili, 2011). Während der Messungen wurden Lösungen ähnlicher Ionenstärke verwendet, was eine konstante Debye-Länge für beide Oberflächen gewährleistete. Der Ionenradius wurde in diesen Versuchen nicht variiert, da lediglich durch das Variieren des pHs am selben Molekül unterschiedliche Ionenvalenzen eingestellt wurden. Die Oberflächenladungsdichte änderte sich für basische pH-Werte nicht (Hartley et al., 1997). Die einzige verbliebene Variable war der Protonierungsgrad, d.h. die Valenz des Spermidins. Im de- und monoprotoniertem Zustand vermittelte Spermidin keine gegenseitige Anziehung, was durch Monte-Carlo-Simulation für die Ionenkorrelation theoretisch vorausgesagt wurde (Guldbrand et al., 1984). Die Anziehung erreichte ein Maximum wenn in der Lösung die triprotonierte Spezies vorherrschte. Diese Beobachtung steht ebenfalls im Einklang mit Monte-Carlo-Simulationen (Guldbrand et al., 1984) und experimentellen Beobachtungen durch verschiedenartige Ionen unterschiedlicher Valenzen (Manning, 1969). Aufgrund dieser Beobachtung wurde die theoretische ermittelte Fitgleichung verwendet. Diese Messungen zeigten erstmals die Abhängigkeit

der Ionenkondensation und Ionenkorrelation von der Ionenvalenz unter sonst konstanten Bedingungen (Ionenradius, Oberflächenladungsdichte und Debye-Länge). Außerdem konnte mittels der Fitgleichung nachgewiesen werden, dass die Anziehungskraft der Gleichgewichtslage der unterschiedlich protonierten Spezies folgt (Abbildung 5.2 A, Gl. 3.6).

5.1.3 Konzentrationsabhängigkeit der spermidinvermittelten Attraktion

Die bei konstanten pH-Werten und verschiedenen Spermidinkonzentrationen durchgeführten Kraft-Abstands-Messungen zeigten keinen eindeutigen konzentrationsbedingten Trend (vgl. Abbildung 5.2 B). Sämtliche konzentrationsgleichen Werte für attraktive Kräfte bei pH 7.8 und pH 9.0 unterschieden sich signifikant (Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test $p < 0.001$ für sämtliche Werte). Es war jedoch zu beobachten, dass die Werte bei einer Verschiebung des pHs in saurere Bereiche eine höhere Streuung aufwiesen, die außerhalb ihrer Standardabweichungen lag (Abbildung 5.2 A), d.h. hier liegen Werte vor, die nicht aus derselben Grundgesamtheit stammen (ANOVA, $p < 0.001$). Für die pH-Werte 7.8 und 9.0 sind die Wechselwirkungskräfte signifikant unterschiedlich (ANOVA, $p < 0.001$). Die Grenzflächen negativer Oberflächenladung zeigten bei einem pH-Wert von 10.5 weder in spermidinfreien noch in spermidinhaltigen Lösungen hohe Wechselwirkungskräfte. Der höchste Mittelwert lag bei 0.10 mg/ml vor (0.21 N/m ($\pm 0.16 \text{ N/m}$)), der kleinste Wert wurde bei 0.03 mg/ml (0.01 N/m ($\pm 0.002 \text{ N/m}$)) beobachtet. Sämtliche anderen Werte lagen in diesem Rahmen. Die Mittelwerte zeigten sich im ANOVA-Test dennoch signifikant unterschiedlich ($p > 0.001$). Die Wechselwirkungen verschwanden bei deprotoniertem Spermidin bei pH 12 nahezu ganz (Werte $< 0.01 \text{ N/m}$), unterschieden sich aber konzentrationsabhängig signifikant in ihren Mittelwerten ($p < 0.0005$).



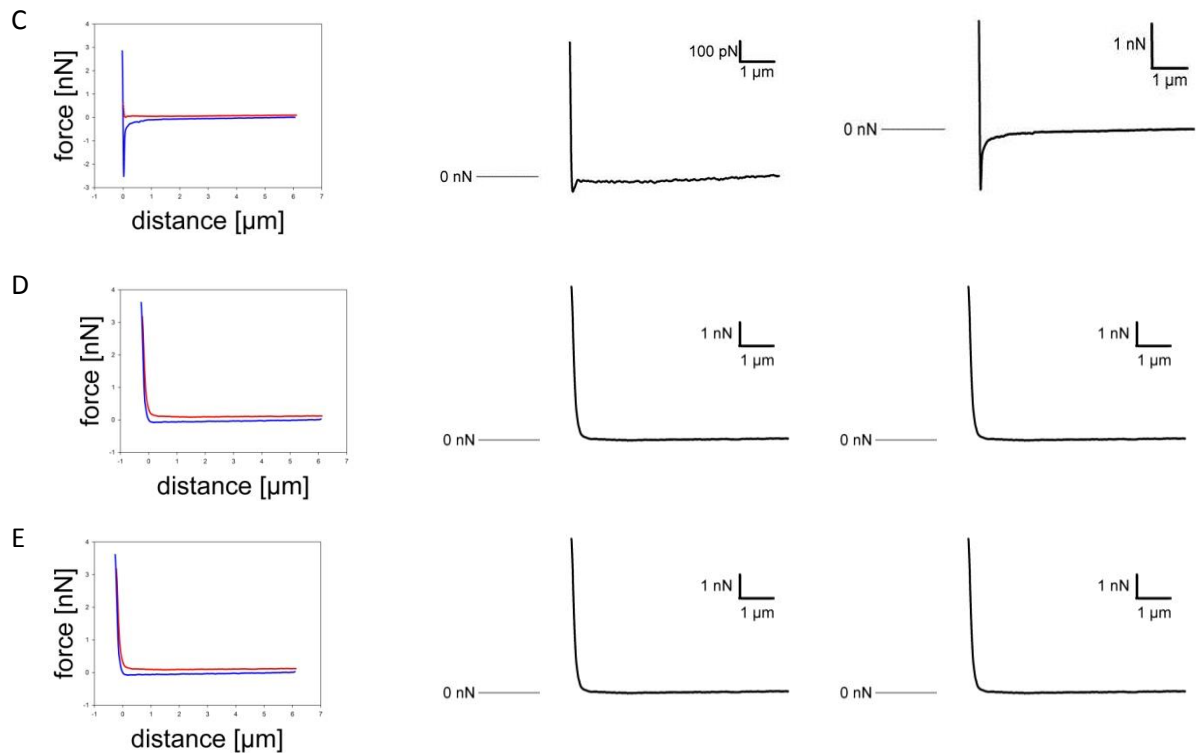


Abbildung 5.3: Exemplarische Darstellung von Kraftkurven aus den Messungen. (A) Messungen in spermidinfreien Lösungen; (B) Messungen bei pH 7.8; (C) Messungen bei pH 9.0; (D) Messungen bei pH 10.5; (E) Messungen bei pH 12. Sämtliche Kurven wurden mit einer konstanten Zuggeschwindigkeit von 20 $\mu\text{m/s}$ gemessen. Die Adhäsionswerte zeigten in einer Varianzanalyse (ANOVA) signifikant unterschiedlich.

In Abbildung 5.2 wurde gezeigt, dass die Kraftwerte zum sauren Bereich der pH-Skala hin auffächern. Die Variation der Werte bei unterschiedlichen Konzentrationen zeigte keinen klaren grundlegenden Mechanismus. Eine Interpretationsmöglichkeit bietet die zeitabhängige Protonierung bestimmter Stickstoffgruppen des Spermidins (Kimberly and Goldstein, 1981). In Tabelle 5-2 wurde die Protonierungsdauer der einzelnen Stickstoffgruppen über einem unbestimmten Zeitintervall zusammengefasst. Demnach könnte die Auffächerung der Werte der zufälligen Verteilung der zeitabhängigen Protonierung der einzelnen Gruppen folgen. Innerhalb einer eingestellten Konzentration zeigten die Werte allerdings keine große Streuung.

Protonierungsgrad	Zeit der Protonierung N_A [%]	Zeit der Protonierung N_B [%]	Zeit der Protonierung N_C [%]
monoprotoniert	43 %	32 %	32 %
diprotoniert	86 %	42 %	42 %
triprotoniert	92 %	95 %	94 %

Tabelle 5-2: Protonierungsdauer der einzelnen Stickstoffgruppen in Prozent über einem durch NMR-Messungen festgelegten Zeitintervall (1400 Hz – 3000 Hz, Kimberly and Goldstein, 1981)

5.1.4 Umschlagpunkt des Effekts

In Abbildung 5.3 wurde exemplarisch für jeden vor den Messungen eingestellten pH-Wert eine Kraft-Abstands-Kurve dargestellt. Abbildung 5.3 A zeigt eine Messung ohne Spermidin bei pH 7.8. Bei sämtlichen pH-Werten >7.8 wurde in spermidinfreien Lösungen keine attraktive Wechselwirkung zwischen den Oberflächen beobachtet. Dieses Verhalten steht im Einklang mit der Literatur (Hartley et al., 1997) und Vorhersagen der DLVO-Theorie (vergl. Anhang). Abbildung 5.3 B - E zeigt Messungen in Gegenwart von Spermidin.

Für einen pH Wert von 7 (vergl. Abbildung 5.3 B und Abbildung 5.2) wurde in spermidinfreier Lösung eine attraktive Kraft von 0.49 N/m ($\pm 0.43 \text{ N/m}$) beobachtet. Durch den Tausch der spermidinfreien Lösung mit Spermidinlösungen variierender Konzentration ($0.01 \text{ mg/ml} - 0.10 \text{ mg/ml}$) erlosch die Attraktion der Oberflächen bzw. zeigte Minima in den Kraft- Abstands-Kurven, die innerhalb der Grenze einer durch das thermische Rauschen verursachten Rastersondenschwingung lagen ($< 0.01 \text{ nN}$). Dieser Messpunkt stellte eine Ausnahme dar und soll im Folgenden eingehend diskutiert werden:

Lyons et al. (1981) beschrieben pH-abhängige Alterungseffekte, die auch bei kurzzeitiger Einwirkung einer Lösung bei einem bestimmten pH eine Wirkung zeigten. Abhängig von der Ionenkonzentration ($10^{-3} - 10^{-2} \text{ M KCl}$) zeigten diese Lösungen eine Umpolung der Muskovitoberflächen zu positiven Ladungen für pH-Werte <8 . Andere Autoren beschrieben bei der Interpretation ihrer Kurzzeitmessungen weniger stark ausgeprägte Effekte. Bei Zeta-Potential-Messungen wurde eine Erniedrigung des negativen Potentials auf Muskovitoberflächen ab pH 7 gezeigt, wohingegen es für basischere pH-Werte ($>\text{pH } 7$) konstant war ($\approx 40 \text{ mV}$, Nishimura et al., 1992). Durch Studien an einem Borosilikat – Muskovit System, die eine AFM-basierte Technik mit Strömungspotentialmessungen und Elektrophorese verglichen, wurde ebenfalls eine Erniedrigung des negativen Oberflächenpotential bestimmt (Hartley et al., 1997). Sämtliche Methoden zeigten eine Positivierung des Oberflächenpotentials um pH 7 für beide Materialien. Es wurden lediglich materialabhängig unterschiedliche Oberflächenpotentiale für pH-Werte >7 gezeigt (Elektrophorese $\approx 110 \text{ mV}$ für Borosilikat, Strömungspotential und AFM: 80 mV für Muskovit, Hartley et al., 1997). In einer anderen Studie zeigte Borosilikat, das als Isolator einer pH-Elektrode Verwendung fand, eine Umpolung der negativen Oberflächenladung (pH 8 -10 $\approx 350 - 40 \text{ mV}$) bei einer Überführung in saurere pH-Bereiche (pH 7; 0 mV ; Harame et al., 1987). In Monte-Carlo Simulationen konnte gezeigt werden, dass der Ionenkorrelationseffekt neben polyvalenten Ionen eine hohe Oberflächenladungsdichte voraussetzt (Wennerström et al., 1982; Marra, 1986; Kjellander et al., 1988), die mit dem Oberflächenpotential korreliert (Israelachvili and Adams, 1978; Israelachvili, 2011).

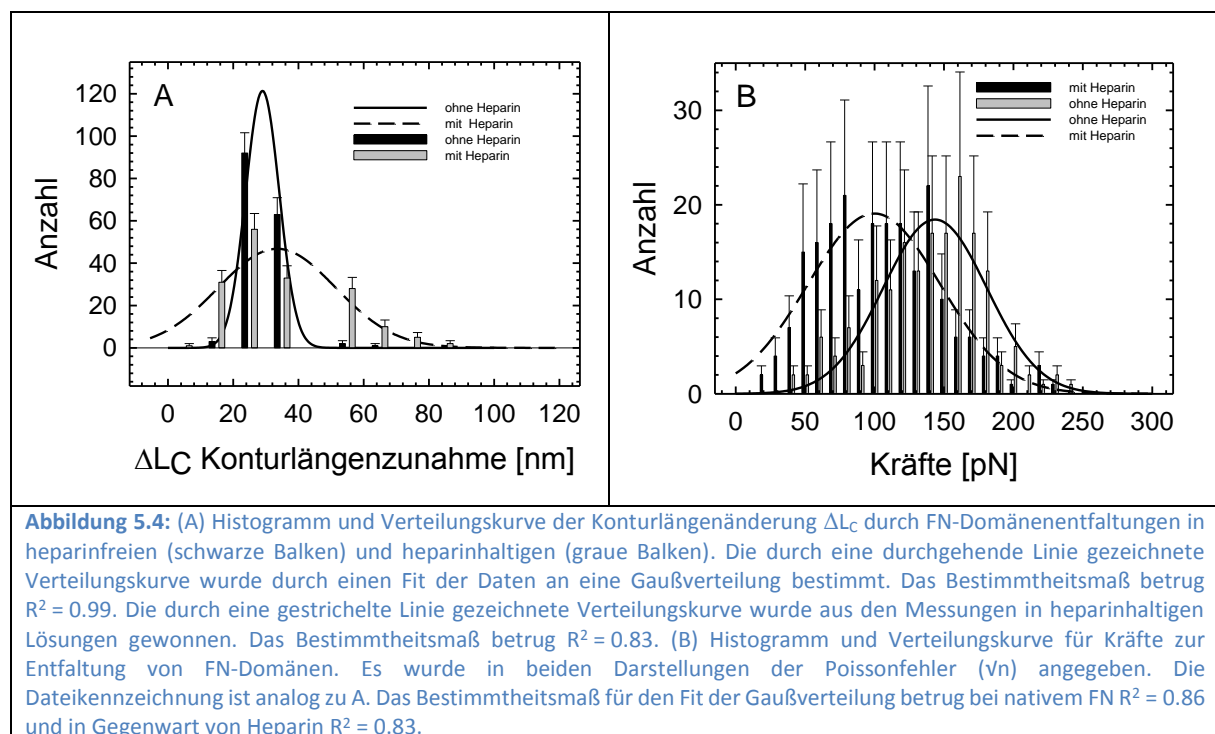
Diese in der Literatur vorliegende Datenlage lässt die Interpretation zu, dass für pH-Werte <7.8 keine ausreichende Erniedrigung der Doppelschichtabstoßung vorlag. Die leicht attraktiven Kräfte zwischen den Oberflächen in Gegenwart spermidinfreier Lösungen bei einem pH-Wert von 7 wurden von Hartley et al. (Hartley et al., 1997) ebenfalls beschrieben und waren zudem statistisch von spermidinhaltigen Lösungen nicht signifikant zu unterscheiden. Damit erklärt sich eindeutig die Auslöschung der attraktiven Wechselwirkung, weshalb der entsprechende Datenpunkt bei der Anpassung der Fitgleichung nicht berücksichtigt wurde. Auf indirektem Weg bestätigen die dargelegten Beobachtungen die Messungen der oben aufgeführten Autoren.

5.2 Charakterisierung der Zell-Oberflächen-Schnittstelle: spezifische Bindung

5.2.1 Beschreibung des Systems

In diesem Kapitel sind die Experimente beschrieben, die zur Bestimmung von Entfaltungsmechanismen und zur Untersuchung der Äffinitätsregulierung für Integrine durchgeführt wurden. Die Messungen erfolgten dabei an dem EZM-Protein FN und erlaubten die Charakterisierung von dessen struktureller Stabilität. Die für die Auswertung ausschlaggebenden Kriterien waren die für die Entfaltung notwendige Kraft F sowie die jeweilige Zunahme der Konturlänge ΔL_C . Die Auswertung erfolgte nach dem WLC-Modell (vgl. Kapitel 3.2). Mittels der Konturlängenzunahme, d.h. der Länge einer entfalteten modularen Domäne, konnte die Anzahl der Aminosäuren pro Domäne bestimmt werden. Anschließend wurden die gemessenen Werte mit Literaturwerten verglichen. Die Länge die jede Aminosäure einer Primärstruktur zur Gesamtlänge des Proteinerückgrats beiträgt, beträgt laut Literatur ca. 3.8 Å (Oberhauser et al., 2002).

5.2.2 Mechanische Entfaltung von FN



Die Verteilung in Abbildung 5.4 A zeigt die unterschiedlichen Konturlängenzunahmen ΔL_C , die sich durch Entfaltungen von FN-Domänen in heparinfreien und heparinhaltigen Lösungen ergaben. Während der Experimente wurde mit einer konstanten Zuggeschwindigkeit von 5 $\mu\text{m/s}$ gemessen. Die schwarzen Balken spiegeln ΔL_C -Werte wieder, die sich bei Entfaltungsereignissen von FN-Domänen

in heparinfreien Lösungen ergaben. Die grauen Balken zeigen Konturlängenänderungen durch Entfaltungseignisse in heparinhaltigen Lösungen. Aus diesen Verteilungsfunktionen wurden die durchschnittlichen ΔL_C -Werte (Mittelwert (MW)) bestimmt. Sie betrugen 28.97 nm (76 Aminosäuren) mit einer Standardabweichung (SA) von ± 0.43 nm für natives FN und $33.41 \text{ nm} \pm 3.22 \text{ nm}$ (MW \pm SA) für das von Heparin destabilisierte FN. Beide Mittelwerte waren statistisch signifikant unterschiedlich (t-Test, $P > 0.05$). Die Konturlängenzunahme des Polymers bei Domänenentfaltung für natives FN entsprach den Literaturwerten (28.5 nm, 75 Aminosäuren, Oberhauser et al., 2002). Die destabilisierende Wirkung des Heparins führte zu einer symmetrischen Verbreiterung um den Mittelwert. Beide Verteilungen entstammten normalverteilten Daten (Shapiro – Wilk Test) mit $P = 0.14$ für natives FN und $P = 0.15$ für destabilisiertes FN.

Abbildung 5.4 B zeigt die Häufigkeitsverteilung der Entfaltungskräfte nativen FNs ohne, sowie unter dem Einfluss von Heparin. Die durchschnittliche Kraft, die zur Entfaltung der Proteine nötig war, betrug für natives FN $143.52 \text{ pN} \pm 3.09 \text{ pN}$ und für destabilisiertes FN $99.68 \text{ pN} \pm 4.02 \text{ pN}$. Die Mittelwerte sind statistisch signifikant unterschiedlich ($P < 0.001$) und zeigen eine Verschiebung der Gaußverteilung zu geringeren Kräften. Zusätzlich wurde eine leichte Verengung der Verteilungsfunktion beobachtet, die statistisch nicht signifikant war ($P > 0.15$). Beide Datensätze zeigten beim Shapiro-Wilk-Test ein negatives Ergebnis und entstammten somit einer Normalverteilung. Der Wert für natives FN betrug $P = 0.90$, der für destabilisiertes FN $P = 0.08$.

Die durchschnittlich gefundene Kraft zur Entfaltung lag innerhalb des Rahmens der bekannten Entfaltungskräfte für FN-Module (80 pN – 200 pN, Oberhauser et al., 2002). Diese Autoren zeigten, dass die Höhe des Kraftaufwands von der Stellung des Entfaltungseignisses innerhalb der Kraft-Abstands-Kurve liegt (vgl. Kapitel 3.2). Die durchschnittliche Entfaltungskraft für destabilisiertes FN lag mit $99.68 \text{ pN} \pm 4.02 \text{ pN}$ ebenfalls in diesem Rahmen, lässt aber höhere Entfaltungskräfte, wie bei Oberhauser et al. (2002) beschrieben, vermissen.

5.2.3 Hat die Destabilisierung des Fibronektins ihre Ursachen in teilentfalteten Domänen?

Es ergab wenig Sinn die Teilergebnisse im Einzelnen tiefergehend zu diskutieren, da sich Entfaltungskraft und Konturlängenzunahme gegenseitig bedingen. Die Tertiärstruktur von Proteinen ist durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Cantor and Schimmel, 2001). Brechen diese Verbindungen, entfaltet sich ein Protein und zeigt im teilentfalteten Zustand eine geringere Konturlängenzunahme (vgl. Abbildung 5.5). Andersherum besitzt ein teilentfaltetes Protein weniger Wasserstoffbrücken und es wird eine geringere Kraft benötigt, um es vollständig zu entfalten.

Krammer et al. (1999) beobachteten in molekulardynamischen Simulationen eine schrittweise Entfaltung für FN-Module des Typs III. Der Entfaltungsmechanismus des modular aufgebauten Proteins bietet eine Erklärungsmöglichkeit für eine symmetrische Verbreiterung der Häufigkeitsverteilung. Wie in Abbildung 5.5 schematisch dargestellt, ist die Konturlängenänderung bei einer teilentfalteten

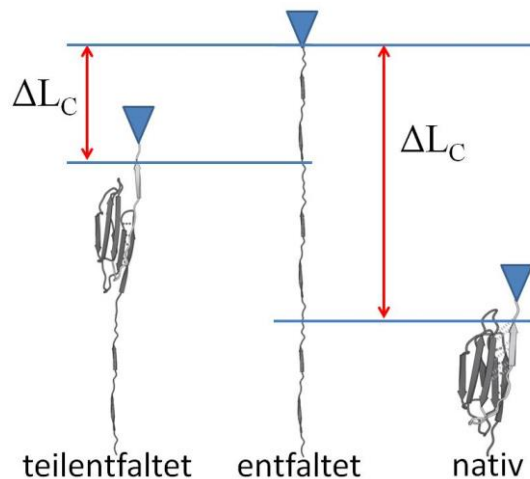


Abbildung 5.5: Variierende Konturlängenänderung teilentfalteter FN-Domänen (Modifiziert nach Krammer et al., 1999)

Domäne verringert. Dieser Entfaltungsweg wurde von Krammer et al. (1999) durch das Anlegen einer konstanten Kraft in ihren mit SMD (steered molecular dynamics) Experimenten erreicht (Kraftpeak: 1556 pN, Entfaltungsgeschwindigkeit: $5 \times 10^7 \mu\text{m/s}$). Sowohl eine Zu- als auch Abnahme der Konturlänge waren bei einer schrittweisen Entfaltung möglich. Gao et al. (2003) beschreiben in SMD-Simulationen einen Mechanismus bei dem stabile teilentfaltete FN III₁-Domänen

beobachtet wurden. Der Entfaltungsweg lief schrittweise ab und führte zur Entfaltung durch geringere Kräfte. Besäße ein Protein beide Spezies, teilentfaltete und native, könnten weniger stabile Zwischenstufen simultan entfalten. Dies würde zu einer Konturlängenänderung führen, die über dem durchschnittlichen Wert für native Domänen läge. Eine verringerte Konturlängenänderung käme durch die Einfachentfaltung einer stabilen Zwischenstufe zu Stande. Teilentfaltete FN-Domänen wurden ebenfalls in Messungen durch chemische Denaturierung beobachtet (Litvinovich et al., 1998).

Durch eine systematische Studie wurde eine stabilisierende Wirkung von Heparin auf FN beschrieben (Khan et al., 1990). Dabei wurde die denaturierende Wirkung von Guanidinhydrochlorid und den Einfluss der Temperatur sowie den strukturellen Einfluss von Lösungsmittel (Ethylenglykol und Polyethylenglykol) auf FN untersucht. Die Autoren untersuchten mittels Fluoreszenzspektroskopie die Fluoreszenzspektren der Aminosäuren Tryptophan und Phenylalanin. Diese Chromophore reagierten mit einer Rotverschiebung ihres Emissionsmaximums hochsensitiv auf einen Wechsel ihrer chemischen Umgebung (z.B. ein Wechsel von hydrophober Umgebung zu hydrophiler Umgebung). Bei der Beobachtung einer konstanten Wellenlänge ergibt sich entsprechend eine variierende Fluoreszenzintensität (Hübler et al., 1998; Cantor and Schimmel, 2001). Die Variation (ein Anstieg der Intensität mit einer steigenden Konzentration des jeweiligen Lösungsmittelanteils in %) fiel in Gegenwart von Heparin weniger stark aus. Die Autoren interpretierten dies als eine Stabilisierung der inneren Struktur und dadurch als einen weniger starken Wechsel der chemischen Umgebung der Chromophore. Eine andere Erklärung war ein gesunkener Einfluss von Ethylenglykol auf die chemische

Umgebung durch eine sterische Hinderung durch Heparin. In jedem Fall war der Anstieg der Fluoreszenzaktivität unter Polyethylenglykoleinfluss durch Zugabe von Heparin unverändert, was gegen eine sterische Hinderung spricht. Diese Ergebnisse widersprachen scheinbar den hier aufgeführten Ergebnissen, da Heparin einen eindeutig destabilisierenden Effekt hatte. In den SMFS Experimenten erniedrigte sich die Kraft, die zur Entfaltung der Strukturen notwendig war. Außerdem verbreitete sich die Konturlängenzunahme symmetrisch. Ein Hinweis zur Klärung dieses scheinbaren Widerspruchs findet der Leser in der Literatur: Für Ubiquitin, ein modular aufgebautes Protein, konnte

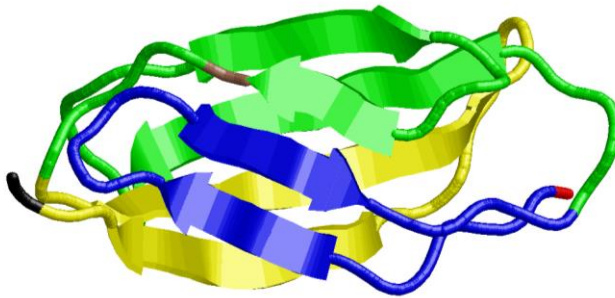


Abbildung 5.6: Entfaltungsweg des FN III₁₀ Moduls. Die blauen Faltblätter entfalten sich zuerst, danach die gelben, der grüne Kern hat als teilentfaltetes Modul eine gewisse Lebensdauer. (Modifiziert nach Krammer et al., 1999, PDB-Code 1FNF, Leahy et al., 1996)

gezeigt werden, dass der gewählte Entfaltungsweg des Proteins sehr stark von dem relativen Angriffspunkt der Kraft abhängt. Bei SMFS-Experimenten ist der Angriffspunkt der Kraft durch die Reaktionskoordinate, entlang einer entfalteten Proteinkette vom C- zum N-Terminus oder umgekehrt,

festgelegt. Bei einer chemischen Entfaltung war eine derartig strikt festgelegte Reaktionskoordinate nicht zu beobachten (Carrion-Vazquez et al., 1999a, 2003). Der von Krammer et al. (1999) diskutierte Weg für einen derartigen Mechanismus lieferte ebenfalls Hinweise, in die von Carrion-Vazquez et al. vorgeschlagene Richtung zu denken. Dieser unter der Wirkung einer C-terminal ansetzenden Kraft (schwarz, Abbildung 5.6) eröffnete Entfaltungsweg zieht zuerst die letzten C-terminalen β -Faltblätter (G und F, gelb, Abbildung 5.6) aus der globulären Struktur. Die beiden Faltblätter beherbergen in einem Loop die RGD-(Aminosäure)-Sequenz (Leahy et al., 1996). Anschließend folgen die ersten beiden β -Faltblätter des N-terminalen Endes (blau, Abbildung 5.6). Einige, sich in der Mitte befindenden β -Faltblätter behalten bis zur Preisgabe der vollständigen Konturlänge ihre Struktur (grün, Abbildung 5.6). In diesen Faltblättern liegt ein Phenylalaninrest, welcher bei einer Excitationswellenlänge von 280 nm in den Experimenten von Khan et al. (1990) angeregt wurde. Dieser Rest erfährt bei einer thermodynamischen Entfaltung dieses Faltungsweges keine starke Umgebungsänderung und würde, wenn überhaupt, nur eine schwache Farbverschiebung zeigen. In der Literatur wurden diese Entfaltungswege entlang einer N-C-terminalen Reaktionskoordinate als mögliche Regulatoren für die Affinität der in diesem Modul vorhandenen RGD-Integrinbindungsstelle diskutiert (Erickson, 1994; Leahy et al., 1996; Krammer et al., 1999; Li et al., 2003). Heparin könnte dabei eine unterstützende Funktion und eine Aufgabe bei der Regelung der Affinität zukommen.

Der Entfaltungsweg wurde nur beispielhaft an einer FN III-Domäne diskutiert, wobei die Konturlängenänderung eine gewisse Verteilungsbreite zeigte, die auf die Entfaltung unterschiedlicher Domänen hinwies. Auch bei einer multimodularen Entfaltung, wie bei nativem FN beobachtet, ändert sich die Reaktionskoordinate nicht. Lediglich durch die dimere Quatärstruktur des FNs (Potts and Campbell, 1996) gegeben, die über Schwefelbrücken am C-terminalen Ende der Monomere geknüpft wurde, und aufgrund der stochastischen Verteilung des Kraftapplikationsortes auf der Polymerkette, war eine streng am N-Terminus angreifende Kraft nicht zu gewährleisten. Bei einem ähnlichen Entfaltungsweg aller Domänen würden sich einige Chromophore aufgrund ihrer tertiärstrukturellen Position in eine andere chemische Umgebung begeben und eine Rotverschiebung im Fluoreszenzspektrum verursachen. Ging man allerdings bei variierenden Zugraten von unterschiedlichen Entfaltungswegen aus (Mitternacht et al., 2009), ergäben sich teilentfaltete Tertiärstrukturen, die Phenylalaninreste noch schützen. Multiple Bindungsereignisse könnten allerdings zu einer falschen Schlussfolgerung aus den Daten führen, da unter solchen Umständen ein ähnliches Bild von Entfaltungsereignissen in den Kraft-Abstands-Kurven vorliegt. Die deutliche Verschiebung der durchschnittlichen Kraft, die zur Entfaltung eines Proteins nötig ist, spricht aber für einen Effekt des Heparins auf FN. Da nur weniger als 10 % der Daten Bindungsereignisse zeigten (vgl. Kapitel 4.3), wurden Artefakte, die durch Entfaltung multipler, an die Rastersonde gebundener Proteine auftraten, ausgeschlossen.

Strukturelle, heparinvermittelte Wandlungen und Effekte an FN, wurden in der gegenwärtigen Literatur ausreichend beschrieben (vgl. Kapitel 3.2). Während der FN-vermittelten Zelladhäsion löste Heparin das Bilden fokaler Adhäsionspunkte aus, was eher für eine FN-FN-Interaktion spräche als für einen affinitätsverändernden strukturellen Einfluss (Woods et al., 2000). Eine Aggregation von FN in Gegenwart von Heparin wurde ebenfalls beobachtet. Die Autoren beschrieben Heparin als nötigen, aber nicht ausreichenden Faktor für die Aggregation (Bentley et al., 1985). Die Heparin-FN-Wechselwirkung wurde außerdem als inhibitorisch für das Wachstum arterieller Rinderzellen beschrieben. Diese Wirkungen zeigten proteolytisch gespaltene, heparinbindene FN-Fragmente, die eine spezifische Heparinbindungsstelle besaßen (Homandberg et al., 1992). Zusätzlich beobachteten Dalton et al. (1995) diesen Effekt ausschließlich bei heparinbindenden Fragmenten. Natives FN vermittelte kein verändertes Zelladhäsionsverhalten. Der Ort dieser spezifischen Bindungsstellen konnte experimentell bestimmt werden. In affinitätschromatographischen Versuchen konnte gezeigt werden, dass FN III₁₃ und FN III₁₄ für eine Heparinbindung nötig sind (Barkalow and Schwarzbauer, 1991). Da sich diese Bindungsstellen in der Primärstruktur am C-terminalen Ende befinden, lag im Fall von einem, von spezifischen Bindungsstellen geregelten Mechanismus eine interdomänale Kommunikation nahe (Leahy et al., 1994, 1996).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Heparin eine destabilisierende Wirkung auf FN besaß. Es wurde eine eindeutig geringere Kraft zur Entfaltung von FN in Gegenwart von Heparin benötigt. Die Konturlängenzunahmenverteilung weitete sich um ihren Mittelwert symmetrisch aus. Dieses Verhalten spricht unabhängig von der Konturlängenzunahme für teilentfaltete Domänen. In den hier diskutierten Experimenten konnte erstmals der destabilisierende Einfluss des Heparins auf FN kraftspektroskopisch nachgewiesen werden.

5.3 SCFS-spezifische Auswertung rheologischer Daten

5.3.1 Hertzsche Pressung

Da elastische und viskose Eigenschaften der Zelle getrennt betrachtet wurden, konnte zur Beschreibung des Kontakts zweier elastischer Körper das Hertz-Modell herangezogen werden (vgl. Anhang). Dabei ist eine sphärische Zelle eine wichtige Randbedingung des Modells. Die momentane Geometrie der Zelle wurde während der Messungen lichtmikroskopisch auf ihre sphärische Form geprüft. Die SCFS-Experimente wurden mit einer kurzen Kompressionszeit durchgeführt, um den Einfluss der viskosen Eigenschaften auszuschließen. Aufgrund dieser Randbedingungen konnte ausschließlich elastisches Verhalten des Zellkörpers angenommen werden. Durch einen Fit (Abbildung 5.7 a) konnte mit einer Poisson-Zahl von 0.5 (Wu et al., 1998) und der Annahme einer gleichmäßigen Kompression der Zellhalbkugeln sowohl auf der Cantileverseite als auch auf der der Oberfläche zugewandten Seite, der Elastizitätsmodul ($267 \text{ Pa} \pm 89 \text{ Pa}$) bestimmt werden. Der Elastizitätsmodul war verglichen mit Literaturwerten (Wu et al., 1998) adhärierter Zellen signifikant niedriger, aber konsistent mit Beobachtung der Elastizitätsmodi sphärischer, nichtadhärenter Zellen bestimmt durch andere Autoren (Abbildung 5.7 e, Hynes, 1987; Guilak et al., 1999; Rosenbluth et al., 2006; Bacabac et al., 2008)

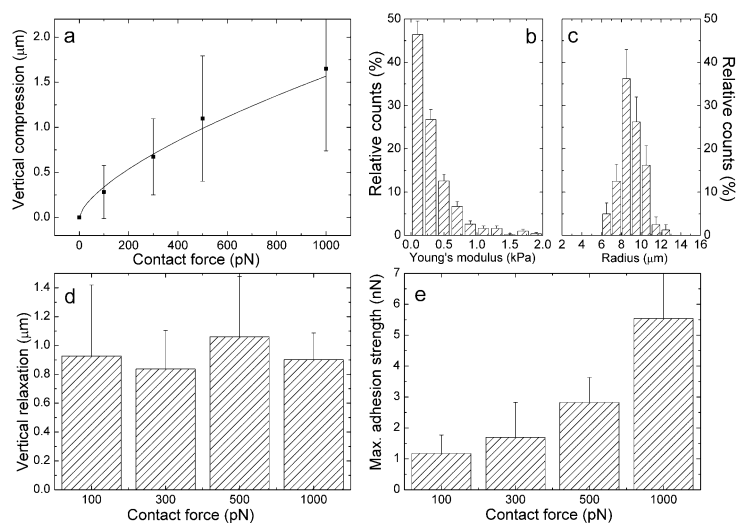


Abbildung 5.7: Rheologische Eigenschaften muriner Fibroblasten (L929). (a) vertikale Kompression mit Kurvenanpassung an das Hertz-Modell. (b) Verteilung der Elastizitätsmodule (relative Anzahl und Poissonfehler). (c) Zellradiusverteilung (relative Anzahl und Poissonfehler). (d) Höhenabnahme der Zelle (MW und SA). (e) Maximale Adhäsionsstärke

Die Elastizität und der Radius bestimmten das Ausmaß des Radius` (a) der Zell-Oberflächen-Schnittstelle. Da spezifische Oberflächenbindungen lediglich innerhalb der Kontaktfläche der Zelle zur Oberfläche ausgebildet wurden, bot eine Kontaktflächenvergrößerung (vgl. Kapitel 3.3) eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine höhere Anzahl an Rezeptorbindungen, wie z.B.

durch Integrine (Hynes, 1987; Liu, 2000; Takagi et al., 2003; Luo et al., 2007). Die durch das Hertz-Modell beschriebene Zellelastizität führt zu einer Proportionalität der Kontaktfläche mit der Oberfläche und der vertikalen Kompression der Zelle (Puttock and Thwaite, 1969).

5.3.2 Viskoelastische Betrachtung der Zelleigenschaften

Der initialen, kraftabhängigen und streng elastischen Ausbreitungsphase schloss sich eine viskoelastische, kraftunabhängige Phase der Zellausbreitung an. Abbildung 5.7 d zeigt die Ausbreitung, d.h. das anschließende Abflachen der Zelle nach der initialen, streng elastischen Ausbreitung eines murinen L929 Fibroblasten nach einer Kontaktzeit von 20 s bei unterschiedlichen Krafteinwirkungen (bis zu 1000 pN). Durch die unterschiedlichen Kraftapplikationen änderte sich die Abflachung der Zelle nicht und es fand keine weitere Vergrößerung der Kontaktfläche zur Oberfläche statt. Da die Adhäsionsstärke der Zelle bei gleicher Kontaktzeit (20 s, vgl. Abbildung 5.7 d und e) über einen Kraftbereich von 100 pN - 1000 pN (siehe oben) stieg, ist dieser Effekt einer in der elastischen Ausbreitungsphase gebildeten Kontaktfläche zuzuschreiben. Die Kontaktfläche der Zelle vergrößerte sich kraftabhängig (Elter et al., 2010). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Ausbreitung der Zelle in zwei Phasen unterteilt werden kann: Eine elastische Phase, die durch die einwirkende Normalkraft eine Membran-Oberflächen-Schnittstelle bildet, sowie eine viskoelastische, kraftunabhängige Phase.

5.3.3 Kraftabhängige Viskoelastizität (Anwendung des Kelvin-Voigt Modells)

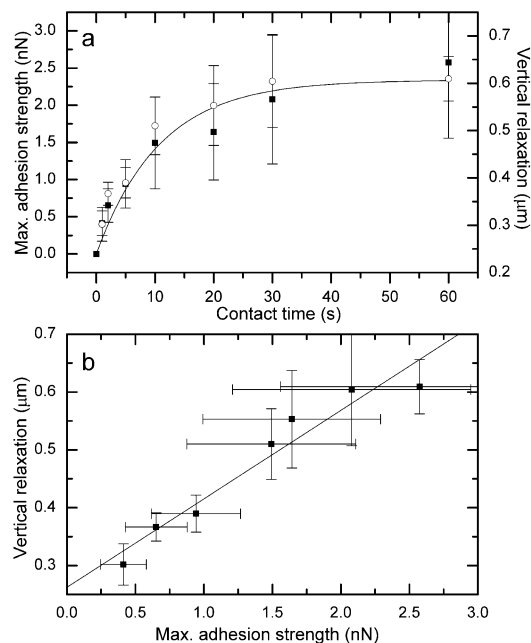


Abbildung 5.8: (a) Kinetische Entwicklung der maximalen Adhäsion und der vertikalen Relaxation (MW und SA Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0.94$). (b) Korrelation zwischen vertikaler Relaxation und maximaler Adhäsionsstärke (MW und SA)

Zum besseren Verständnis der viskoelastischen Zellausbreitung wurde in ergänzenden SCFS-Experimenten die Kontaktkraft konstant gehalten (Sollwert: 500 pN) und die Kontaktzeit zwischen 1 s und 60 s variiert. Zur Gewährleistung konstanter Randbedingungen während der Messungen war neben der konstanten Kraft, einem vergleichbaren Zellradius und den SCFS-üblichen Rahmenbedingungen (vgl. Kapitel 4.4) ein sphärischer Zellkörper zur Anwendbarkeit des Hertz-Modells Voraussetzung. Die durch diese Experimente bestimmte Zeitabhängigkeit der Adhäsionskraft fordert außerdem eine konstante initiale kraftabhängige Pressung des Zellkörpers.

In Abbildung 5.8 a wurde die Adhäsionsstärke (linke Skala) der Zelle für verschiedene Kontaktzeiten verglichen. Setzt man die eingangs diskutierten konstanten Bedingungen voraus, stieg die Adhäsionsstärke der Zelle kontinuierlich an und lief gegen einen maximalen Adhäsionswert als Grenzwert (< 2.5 nN). Zur Beschreibung des Materialverhaltes des Zellkörpers konnte eine modifizierte

Variante des Kelvin-Voigt-Modells (Gl. 5.1) zur Erklärung der steigenden Adhäsionsstärke herangezogen werden, das sowohl die vertikale Relaxation für viskoelastische Körper als auch die Adhäsionsstärke erklärte (Abbildung 5.8 a linke und rechte Skaleneinteilung). Durch die Abflachung der Zelle vergrößert sich die Kontaktfläche der Zelle zur Oberfläche, wodurch die Reaktionsfläche zur Ausbildung von Zell-Oberflächenverbindungen stieg. Das hatte unmittelbar eine Erhöhung der Adhäsionsstärke zur Folge (siehe oben). An dieser Stelle sei nochmals eingehend darauf hingewiesen, dass die initiale, elastische Abflachung der Zelle im hertzschen Sinne von der viskoelastischen Abflachung getrennt betrachtet wurde. Das streng viskoelastische Kontaktvorgänge beschreibende Kelvin-Voigt-Modell fand an dieser Stelle nur Erwähnung, da bei konstanter Kraft und vergleichbaren Zellradius (vgl. Abbildung 5.7 c) eine vergleichbare, initiale Kontaktfläche entstand. Wird also wie in Abbildung 5.8 a die zeitabhängige Adhäsionsstärkenzunahme betrachtet und ist diese, wie in Abbildung 5.8 b gezeigt mit der vertikalen Relaxation der Zelle proportional, konnte das Kelvin-Voigt Modell auch als modellhafte Erklärung für die Zunahme der Adhäsionsstärke Anwendung finden. Wie allerdings in Kapitel 3.3 diskutiert, sind die aus dem Fit erhaltenen Konstanten keine Materialkonstanten und werden in folgenden als C bezeichnet und zur Unterscheidung jeweils mit einem Index versehen.

$$C = C_1 [1 - \exp(C_2 \cdot t)] \quad \text{Gl. 5.1}$$

Hierbei stellte t die Zeit dar. C_1 ist ein Fitparameter und definiert die Plateauhöhe, d.h. die Maximalkraft ($2.34 \text{ nN} \pm 0.19 \text{ nN}$, $MW \pm SA$), die nötig ist die initial adhärenzte Zelle von der Oberfläche zu lösen. C_2 ist die Steigung ($0.09 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$, $MW \pm SA$) der Kurve.

Die vertikale Relaxation der Zelle korrelierte für Werte $< 60 \text{ s}$ linear mit der Zunahme der Adhäsionskraft. Da während der Messung eine Oberflächenanpassung der Zelle stattfand, was mit erwähnter Schnittstellenvergrößerung einhergeht, ist das Ausbilden von Adhäsionsbindungen in dem gewählten Messzeitraum und der gewählten Zeitskala relaxationsbedingt. Kinetische Gleichgewichte waren, da auf einer weitaus kleineren Zeitskala beheimatet, für die diskutierten Adhäsionsbindungen bei konstanter Retractgeschwindigkeit unerheblich (Bell, 1978). Adhäsionskräfte stiegen nach der initialen Phase für Kontaktzeiten wesentlich größer als 60 s in einem Kurvenverlauf, der nicht nach rein rheologischen Modellen diskutiert werden konnte, sondern zu zelluläre Reaktionen wie Ausbildung des Zytoskeletts sowie die steigende Organisation von einzelnen Adhäsionsbindungen zu fokalen Adhäsionspunkten (focal adhesion) führt. Diese molekularen, zellulären Prozesse führten zu einer starken Oberflächenadhäsion (Geiger et al., 2001) zu deren Bestimmung sich geeignetere Methoden wie etwa die Bestimmung der zur Loslösung der Zellen nötigen Scherkräften (Weiss, 1961; Deligianni et al., 2000). Die Ausbreitung während der initialen Adhäsion war nicht mit der Ausbreitung der Zellen während der Ausbildung fokaler Adhäsionspunkte zu verwechseln, die ihnen die zellcharakteristische

Morphologie verlieh. Dieser Prozess beinhaltet aktive Prozesse, die nicht durch die Materialeigenschaften der Membran gegeben sind (Carter et al., 1981; Rauvala and Hakomori, 1981; Rauvala et al., 1981). In diese Prozesse sind energieverbrauchende Vorgänge involviert, die über eine Integrin-Zytoskelettverbindung eine Umordnung der initialen Adhäsionssots innerhalb der Zellmembran vornehmen und somit auch die Gestalt der Zelle ändern können (Geiger et al., 2001b).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass

- Die Zellausbreitung auf Titanoberflächen in zwei Ausbreitungsphasen unterteilt werden kann. Während die erste Phase streng elastisch und kraftabhängig ist, ist die zweite Phase viskoelastisch und kraftunabhängig.
- Durch die anfängliche initiale und elastische Phase bildet sich eine Kontaktfläche zur Oberfläche, deren Durchmesser dem Modell der Hertzschen Pressung folgt und demnach kraftabhängig ist.
- Diese Kontaktfläche bildet eine Reaktionsfläche, die größenabhängig die Adhäsionsstärke proportional beeinflusst. Die Größe dieser Kontaktfläche determiniert die Stärke der initialen Adhäsion.
- Bei konstanter normaler Kontaktkraft vergrößert sich die Reaktionsfläche als Funktion der Zeit kontinuierlich. Diese Relaxation ist viskoelastisch und folgt dem Kelvin-Voigt-Modell.
- Die Relaxation der Zelle und die Zunahme der Adhäsionsstärke sind linear. Gegeben durch diese Proportionalität kann die mathematische, das Kelvin-Voigt-Modell beschreibende Gleichung zur Bestimmung der zeitaufgelösten Betrachtung der Adhäsionsstärkenzunahme herangezogen werden.

5.4 Zelladhäsion und Rheologie auf verschiedenen Oberflächen

5.4.1 Initiale Adhäsion in Abhängigkeit von der Oberflächenbeschaffenheit und dem rheologischen Verhalten muriner Fibroblasten

Die in SCFS-Experimenten gewonnenen Daten wurden zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften muriner Fibroblasten (L929) auf biokompatiblen Materialien (siehe Tabelle 3) zur Prüfung ihrer Verwendbarkeit in Multisensoriksystemen und Bioreaktoren verwendet. Die in Kapitel 4.1.3 erklärte Methodik zur Bestimmung der maximalen Abrisskräfte fand als Maß der materialabhängigen Zelladhäsion Verwendung. Die Anzahl der Bindungsereignisse repräsentierten ein Maß für die physiologische Aktivität der Zelle.

In dem Gesamtverlauf dieser Studie wurden die Messungen auf den jeweiligen Oberflächen in einem vorher einprogrammierten Raster zu jeweils 16 (4x4) Messungen durchgeführt, was eine etwaige Beeinflussung der Oberfläche durch ein vorheriges Bindungsereignis ausschloss. In der veröffentlichten Literatur wurde als ersten Schritt der Integration von Fremdmaterialien (z.B. bei Implantaten) in ein Gewebe die Adsorption von EZM-Proteinen beschrieben (Grinnell and Feld, 1981). Da diese EZM-Proteine Bindungsstellen für Integrine, Transmembranproteine zur spezifischen Zelladhäsion (Hynes, 1987), bereitstellen, boten SCFS-Messungen einen Einblick in den Mechanismus der spezifischen Integrin- und EZM-Protein-Reaktion (Benoit et al., 2000; Li et al., 2003; Taubenberger et al., 2007). Zusätzlich zu der integrinvermittelten Adhäsion entstanden zwischen der Oberfläche und der Zelle unspezifische Verbindungen (vgl. Kapitel 5.1), die in das Messergebnis einfließen und somit eine genauere Charakterisierung der Integrin-EZM-Bindung zusätzlich erschwerten (vgl. Kapitel 5.2). Dieses Zellverhalten wurde auf allen vermessenen Materialien als grundsätzliches rheologisches Zellverhalten angenommen. Es wurde vorausgesetzt, dass sich bei einem Kontakt der Zelle für

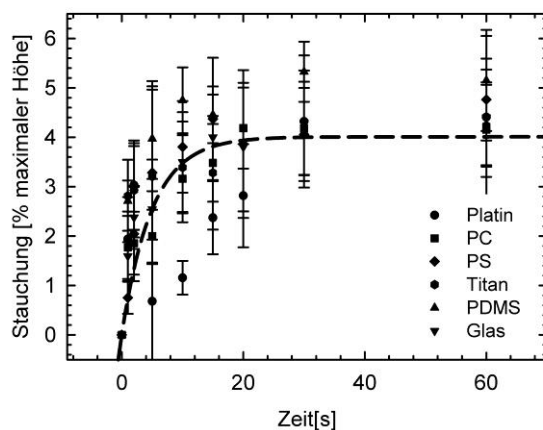


Abbildung 5.9: Rheologisches Verhalten muriner Fibroblasten in SCFS-Experimenten mit einer Kontaktkraft von 500 pN und einer Zugrate von 5 $\mu\text{m/s}$ auf verschiedenen Oberflächen (MW und SA).

Kontaktzeiten < 20 s (vergl Kapitel 5.3.1) auf dem jeweiligen Substrat keine Oberflächen, d.h. materialbedingten Änderung des Elastizitätsmoduls einstellten. Bei konstantem Elastizitätsmodul lag ein einheitliches, elastisches Zellverhalten vor. Die jeweilige Kontaktfläche als Reaktionsfläche für Bindungspaare war, wie oben erwähnt, durch die Kontaktkraft definiert. Konstante Messbedingungen und reproduzierbare Daten wurden durch eine konstante Kontaktkraft und eine einheitliche Zugrate erreicht. In der Auswertung der Kurzzeitmessungen (1 s) wurde mit den

Kontaktflächen, die aus der theoretischen Beschreibung der Hertzschen Pressung berechnet wurden, normiert.

Die jeweilige Zellstauchung wurde prozentual bezogen auf den festgelegten durchschnittlichen Zelldurchmesser berechnet. Die in Abbildung 5.9 gezeigte gestrichelte Kurve berechnete sich aus einer exponentiellen Kurvenanpassung nach Gl. 5.1 und zeigte die relative Stauchung eines Fibroblasten auf Titan (vgl. Kapitel 5.3.2). Die als Referenz gewählte Kurve wurde aus der viskoelastischen Stauchung einer Zelle auf einer Titanoberfläche bestimmt und stellt quasi das Bindeglied zwischen den hier

dargelegten Ergebnissen und grundsätzlichen Untersuchungen zum rheologischen Verhalten muriner Fibroblasten aus Kapitel 5.3.2 dar.

Die Standardabweichung der relativen Stauchung muriner Fibroblasten, war auf den verschiedenen Grenzflächen durch Variationen in der Beschaffenheit der Zellmembran (unterschiedlicher Proteingehalt, örtliche Variation in der Phase der Membran und damit ihrer Fluidität (Kehrwert der Viskosität) und durch eine geringe Abweichung der Zellradien zu erklären (Abbildung 5.9). Im Rahmen dieser Standardabweichungen (von ± 2.36 bis ± 3.01) zeigten sämtliche Fibroblasten auf den unterschiedlichen Substraten ein vergleichbares rheologisches Verhalten. Die viskoelastische Ausbreitung der Zelle hing nicht von dem Substrat ab. Die viskoelastische Zellausbreitung während der initialen Adhäsion war substratunabhängig. Wiederum ist dieses Zellverhalten während der beschriebenen initialen Adhäsionsprozesse nicht mit dem Anwachsen und der Ausbreitung einer Zelle und ihrer Morphologie während der log-Wachstumsphase zu vergleichen (Elter et al., 2010; Koester et al., 2010). Verschiedene Autoren beschrieben eine Auswirkung der Oberflächenbeschaffenheit auf die Zellmorphologie nach der initialen Adhäsion. Es wurde eine Abhängigkeit der Zellmorphologie von Fibroblasten und anderer Zelltypen aufgrund der Variation des Elastizitätsmoduls, d.h der Steifigkeit des jeweiligen Untergrunds, beobachtet (Pelham and Wang, 1997; Yeung et al., 2005; Engler et al., 2006; Zaman et al., 2006; Solon et al., 2007). Abhängig von der Rauheit (z.B. Titan) des Adhäsionsuntergrunds (Hallab et al., 1995; Deligianni et al., 2000; Kunzler et al., 2007) zeigten humane Endothelzellen (HEC) auf Methacrylatoberflächen unterschiedlicher Hydrophilität, d.h. unterschiedlicher Oberflächenladung, sowohl unterschiedliche Langzeitadhäsion als auch unterschiedliche Zellmorphologie. Auch für andere Zellarten wurde dieser Effekt beobachtet (van Wachem et al., 1987; Singhvi et al., 1994; Webb et al., 1998). Matschegewski et al., (2010) beschrieben eine Anpassung der Zellmorphologie, quasi ein Mimikry der Zellen, an die geometrischen Gegebenheiten strukturierter Oberflächen.

Die auf Platin bestimmten Werte > 2 s und < 30 s folgten nicht dem Verlauf, der durch das von Elter et al. (2010) angewandte viskoelastische Modell einer Zelle auf Titan beschrieben wurde. Diese Werte erwiesen sich als statistisch signifikant unterschiedlich und entstammen nicht derselben Grundgesamtheit (ANOVA- Analyse $p < 0.01$). Zwischen den Stauchungen der Zellen auf den jeweiligen Grenzflächen variierten die gemessenen Werte (Pt 20 s 3.9 % \pm 0.15 % Stauchung der ursprünglichen Höhe, PC 20s 4.1 % \pm 0.09 % Stauchung der ursprünglichen Höhe, MW \pm SA). Bei der Ausbreitung (Stauchung) der Zellen nach 60 s Oberflächenkontakt zeigte sich eine asymptotische Annäherung an die Konstante C' der Referenzkurve (5.013 % \pm 0.126 % Stauchung der ursprünglichen Höhe, MW \pm SA) für die geometrischen Mittel aller gemessenen Werte. Für die von der Theorie (Gl. 5.1) abweichenden Daten (> 2 s < 30 s, Pt) boten sich zwei Erklärungen an. Solch ein Zellverhalten ergab

sich, wenn die unter dem Cantilever adhärenzte Zelle eine höhere Steifigkeit als die übrigen Zellen der Messreihe besaß und sich deshalb nicht im selben Maße stauchen ließ (was zu einer geringeren prozentualen Stauchung der Zelle im Verhältnis zu ihrer ursprünglichen Höhe führt). Da es sich um Kontaktmechanik zweier Körper, der Zelle und der jeweiligen Oberfläche handelte, wäre, außer einer unterschiedlichen Steifigkeit der Membran aufgrund einer zufällig verschiedenen Komposition ihrer Bestandteile, eine Korrelation beider Oberflächen denkbar. Da es sich bei den hier gezeigten Daten nicht um Einzelmessungen sondern um gemittelte Werte (7 Zellen zu je 16 Kurven pro Zeitpunkt) handelte, wurde eine zufällige unterschiedliche Zusammensetzung der Fibroblastenmembran der Zellen einer Messreihe untereinander von vornherein ausgeschlossen.

Ich möchte nun zur Diskussion der oberflächenkorrelativen Änderungen mechanischer Membraneigenschaften kommen. In der Tat beobachteten Matsumoto et al. (2003) eine Varianz in der Zelladhäsionsstärke in Abhängigkeit von Platinoberflächen in einer *in vivo* (Ratten) und einer *in vitro* (NIH3T3 Fibroblasten) durchgeführten Studie. Sie beobachteten eine vermehrte Zelladhäsion auf einer Platinspule mit Polyvinylalkoholkern (PVA) zur Medikamentenabgabe (fibroblast growth factor (FGF)). Die anfängliche Adhäsion sowie eine biologische Verträglichkeit konnte auf die Platinoberfläche zurückgeführt werden. Das vermehrte Wachstum und die morphologische Variation der Zellkörper war allerdings eindeutig FGF bedingt. Ein weiterer Faktor, der eine auf dieser Zeitskala vorstellbare Änderung der mechanischen Membraneigenschaften hervorriefe, wäre die Abgabe chemischer Substanzen. Für *Escherichia coli* wurden unter der Einwirkung cytotoxischer Phenole Änderung in der Membranzusammensetzung beobachtet (Heipieper et al., 1991). Die äußere Zuführung von Phenol oder 4-Chlorophenol ergab einen dosisabhängigen Ausfluss von ATP bzw. Kalium. Andere organische Verbindungen, wie z.B. die Polyamine (besonders Spermidin vgl. Kapitel 5.1), können als polyvalente Ionen eine Adhäsion zwischen Oberflächen gleichartiger Ladung vermitteln (Bohinc et al., 2004; Frank et al., 2008; May et al., 2008). Als ein biokompatibles Material (Beard et al., 1992; Hehrlein et al., 1995; Vince et al., 2004; Lago et al., 2007) ist Platin wie sämtliche in den Messungen verwendeten Materialien (PDMS (Leclerc et al., 2003; Gerecht et al., 2007; Fuard et al., 2008), PC (Kessler et al., 2003), Titan (Elter et al., 2010; Karjalainen et al., 2010; Lange et al., 2010; Matschegewski et al., 2010), Glas (Sasanaluckit et al., 1993; Oliva et al., 1996; Ahmed et al., 2004a, 2004b, 2004c) nicht zytotoxisch, d.h. es werden keine oder lediglich in sehr geringer Konzentration Verbindungen ins Medium abgegeben. Eine direkte mechanische Beeinflussung der Zellmembran durch Abgabe von molekularen Verbindungen dieser Materialien ist in der derzeitigen Literatur nicht beschrieben. Chemische Verbindungen können auf Zellen und ihre Membranen wirken, sind in der Literatur allerdings eher durch Langzeitwirkungen mittels Genregulierung erklärt (Gerecht et al., 2007). Eine direkte Wirkung auf die Verstoffwechslung verschiedener Zellgifte wurde dennoch beschrieben (Buehler et al., 2011). Eine weitere Ausnahme bilden natürlich Komponenten der Membran wie Cholesterin, lipophile

Proteine oder Fettsäuren. Chabanel et al., (1983) demonstrierten beispielsweise die Änderung der Viskoelastizität von roten Blutkörperchen. In der gegenwärtigen Literatur werden membraneigene Verbindungen zur Änderung der Fluidität und/oder zur Phasenverschiebung eingesetzt. Diese zusammenhängenden Prozesse könnten die mechanischen Eigenschaften einer Membran ändern (Evans and Needham, 1987; Needham and Nunn, 1990; Heimbürg, 1998, 2000; Ebel et al., 2001; Zuckermann and Heimbürg, 2001; Byfield et al., 2004; Siegel and Kozlov, 2004). Gegensätzlich zu Gericht et al. (2007) werden derzeit chemische Verbindung wie Anästhetika doch als Auslöser für eine thermodynamisch bedingte Änderung der mechanischen Eigenschaften der Membran angesehen (Heimbürg and Jackson, 2007). Während der Messung wurde die Temperatur stabil gehalten (37°C) und keine Verbindungen der oben aufgeführten Art waren zugegen der auftretende Effekt der Stauchung auf Titanoberflächen konnte an Hand dieser Literatur nicht geklärt werden.

Lediglich für Nanopartikel dieser und anderer Materialien ist eine gewisse Toxizität beschrieben, die neben anderen metabolisch-zytotoxischen Effekten zur Zerstörung von Zell- bzw. Kompartimentmembranen führen kann. Diese Tatsache sei an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber erwähnt, da in der Literatur Zerstörungen der Membranen und keine Veränderung globaler mechanischer Einflüsse beschrieben sind (Powell et al., 1996; Lai et al., 2008; Moos et al., 2010). Eine nanopartikelbedingte Änderung mechanischer Eigenschaften konnte durch Literaturrecherche dennoch nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Diese mögliche Erklärung bleibt nach Literaturaussagen, die zur Versuchsplanung berücksichtigt wurden (Powell et al., 1996) und nach den in dieser Literatur verwendeten Methoden (besonders bei ähnlichem Handling der Proben) sowie der Tatsache, dass dieser Effekt ausschließlich auf der verwendeten Titanoberfläche auftauchte, allerdings unwahrscheinlich. Zusätzlich wäre eine unspezifische Änderung der Adsorptionskinetik (vgl. Kapitel 5.1), wie es am Beispiel von unilamellaren Eigelb-Phosphatidylcholine-Vesikeln beobachtet wurde, zu diskutieren (Reimhult et al., 2002). Die Möglichkeiten hierzu wären nach Gl. 3.12 eine Änderung der Temperatur T oder eine Änderung der Anzahl der Reaktionspartner (n_r und n_l). Da es sich um dieselbe Zelle handelt, die anfänglich ein uniformes Verhalten zeigte, die Experimente auf derselben Oberfläche durchgeführt wurden und somit nur eine sehr geringe, durch zelluläre Ausscheidung (Geiger et al., 2001b) bedingte Zunahme von Rezeptormolekülen stattfand, ist eine Veränderung der Reaktionskinetik ebenso unwahrscheinlich.

Breitete sich die Zelle während des Verlaufs der Messung unter der Rastersonde aus, ergäbe sich eine alternative Erklärungsmöglichkeit für das vorliegende Zellverhalten. Durch die nun geringere Höhe und vor allem durch das höhere E-Modul der Zelle im ausgebreiteten Zustand würde sich eine geringere relative Stauchung ergeben, da adhärente Zellen einen signifikant höheren Elastizitätsmodul zeigen (Wu et al., 1998; Elter et al., 2010; Elastizitätsmodul: 2.23 kPa/adhärent – max. 1.75 kPa/sphärisch).

Für Messungen >20 s lagen die ermittelten relativen Stauchungen innerhalb der Standardabweichungen ($\pm 1.5\%$). Es wurde ein uniformes Zellverhalten beobachtet. Die in diesen Versuchen bestimmte Faktenlage lässt ein Ausbreiten der Zelle plausibler erscheinen. Bei einer Ausbreitung der Zelle mit anschließendem Zelltod und dem dann erfolgenden „Abkugeln“, also der entropiegetriebenen Verformung zu einer Kugel, zeigt sich wieder das viskoelastische Verhalten des Membransystems der toten Zelle (Hassan et al., 1996; Kawasaki et al., 2002). Dieser Erklärungsansatz wird außerdem dadurch gestützt, dass die Kraft Abstands-Kurven (60 s) dieser Zellen auf den Grenzflächen Titan und Platin weniger Bindungsereignisse aufwiesen. Bei den mit in das geometrische Mittel einfließenden relativen Stauchungen dieser Zellen handelt es sich, da das rheologische Verhalten der von intakten spärlichen Zellen ähnelt, um eine Zellform der solchen Zellen zumindest ähnelt. Da weniger Bindungsereignisse vorlagen und eine sphärische Form vorliegt, liegt die Vermutung nahe, eine physiologisch inaktive bzw. schwach aktive Zellspezies vorliegen zu haben (Alberts et al., 2008). Durch mangelnde sterile Bedingungen und der Herauslösung der Zelle aus dem Zellverband konnten die experimentell verwendeten Zellen anschließend nicht zurück in die Zellkultur überführt werden und auf ihre Vitalität geprüft werden.

Sämtliche Werte zur Charakterisierung der Zelldeformation wiesen eine breite Verteilung auf. Das führt zu einer hohen Standardabweichung ($>1.5\%$, SA) für die mittleren Stauchungswerte (MW). Die Breite der Verteilung war durch eine unterschiedliche Verteilung von Proteinen in der Membran oder unterschiedliche Fluidität sogenannter Membrandomänen, gegeben. Aufgrund dieser Faktoren reagierten Zellen nur bedingt in einer einheitlichen Weise auf mechanischen Stress (Yawata, 2003; Heimbürg, 2007). Doch nicht nur die zeitlich variierende Zusammensetzung der Membran determiniert ihre rheologische Natur. In der Literatur wird für rote Blutkörperchen ein Alterungsprozess beschrieben, der unterschiedliche viskoelastische Eigenschaften desselben Zelltyps offenbart (Nash and Meiselman, 1983; Waugh, 1987). Die meisten Autoren gehen, ähnlich der Grundannahme dieser Arbeit, zusätzlich von einer sphärischen Zellformen aus (Poznanski et al., 1992; Rosenbluth et al., 2006; Bacabac et al., 2008; Elter et al., 2010). Dabei ist bekannt, wieder durch das gut charakterisierte rote Blutkörperchen, dass Membranproteine wie Bande 3 (Gimsa and Ried, 1995; Hägerstrand et al., 2000) oder chemische Verbindungen (Isomaa et al., 1987; Secomb, 1987) die Zellform bzw. die Oberflächenkrümmung der Membran ändern können. Das hat ebenso eine unterschiedliche Stressantwort zur Folge. In den Messungen wurde darauf geachtet, externe Faktoren wie Temperatur (verändert Membranphasen und Zustände), Leitfähigkeit und pH des Mediums über die Messdauer konstant zu halten. Auch der etwaige Einfluss chemischer Verbindungen wurde streng ausgeschlossen. Da die Zellen vor der Messung nicht synchronisiert wurden, befanden sie sich vor der Loslösung von ihrer Kulturoberfläche (PS) in unterschiedlichen Zellphasen. Es wurde vor den Messungen streng

darauf geachtet, dass die zur Oberflächencharakterisierung benutzten Zellen sphärischer Geometrie waren.

Wie in Kapitel 3.3 erwähnt, ist die rheologische Charakterisierung mittels SCFS-Messungen ausschließlich durch eine Kraftapplikation entlang der Normalen möglich, d.h. die getroffenen Aussagen gelten nur für wirksame Normalspannung und vernachlässigen Tangentialkräfte, Biegemomente und Torsionsspannungen. Wogen der sphärischen Form wurde ein isotropes Materialverhalten angenommen. Eine genauere Betrachtung der Methodik zeigte außerdem unterschiedliche Ansätze zur rheologischen Zellcharakterisierung. Komplexere rheologische Modelle, wie z.B. Kelvin-Ketten, in Serienschaltung vorliegende Kelvin-Voigt-Elemente oder ein Netzwerk zweier Kelvin-Voigt-Schaltungen mit Serien- und Parallelschaltungen ihrer konstituierenden Glieder beschrieben die viskoelastische Scherdeformation von roten Blutkörperchen. Sie lässt sich anhand dieser Modellkombinationen in verschiedene Gruppen einteilen (Poznanski et al., 1992). Das Anlegen eines elektrischen Wechselfeldes zeigte bei einer weiteren bioelektorrheologisch ausgelegten Studie zur Charakterisierung zytoplasmatischer Membranen, dass der mechanische Stress proportional zur relativen Flächenvergrößerung bzw. zur relativen Dickenabnahme der Membran am Ort des Stresses ist (Pawlowski and Fikus, 1993). Durch eine Frequenzanalyse konnte zelltypabhängig diejenige Frequenz gefunden werden, die zu Porationsvorgänge der Zellmembranen führten (Pawlowski et al., 1993; Pawlowski et al., 1996). Der mechanische Widerstand gegen Zug auf eine bestimmte Fläche der Membran wurde mittels Mikropipetten bestimmt aber keinem rheologischen Modell zugeordnet (Evans and Yeung, 1989). Ebenfalls elektorrheologisch wurde die Kriechphase (vgl. Anhang) des sphärischen Schleimpilzes *Neurospora crassa* untersucht (Fikus and Pawlowski, 1989). Die in dieser Studie bestimmten rheologischen Verhaltensweisen sphärischen Zellen decken sich mit den SCFS-basierten Charakterisierung runder L929 Fibroblasten. Die Autoren stellten das viskoelastische Verhalten der Pilzzelle als eine Serienschaltung einer Feder (elastischer Anteil) und eines Kelvin-Voigt-Körpers (viskoelastischer Anteil) dar. In den in dieser Arbeit dargelegten Versuchen schlagen wir einen leicht abweichenden Weg ein. Der elastische, kraftabhängige Anteil wurde, zur Charakterisierung der Kontaktfläche, durch das Modell der Hertzschen Pressung getrennt von den viskoelastischen Eigenschaften der Zelle betrachtet. Die viskoelastischen Eigenschaften wurden, unabhängig von der Interpretationsart (Zellstauchung oder Adhäsionsstärke), ebenfalls als ein Kelvin-Voigt-Körper betrachtet. Trotz des Zellverhaltens auf der Platinoberfläche zeigte sich im Materialverhalten der Zelle signifikant ein rheologisches Modell auf Basis eines Kelvin-Voigt-Körpers ($R^2 = 0.81$). Dabei wurde die Stauchung der Zelle für die Dateninterpretation der Adhäsionsstärken herangezogen.

5.4.2 Hertzsche Pressung auf verschiedenen Oberflächen

Um das substratspezifische, elastische Verhalten muriner L929-Fibroblasten zu charakterisieren, wurden die Kurzzeitwerte der SCFS-Messungen benutzt (1 s). Die aus den Kraft-Abstands-Kurven gewonnenen, gemittelten (Mittelwert), maximalen Adhäsionskräfte wurden mittels einer Fläche normiert, die mit Hilfe des Hertzmodells (siehe Anhang) bestimmt wurde. Dazu wurde die eingestellte Normalkraft auf die Zelle (500 pN), Literaturwerte für das Elastizitätsmodul (125 Pa Elter et al., 2010) und die Poisson-Zahl (0.5, Wu et al., 1998, (0.5 \equiv inkompressibel) sowie ein in den Messungen bestimmter und gemittelter Zellradius verwendet (10 μ m, siehe oben). Da der so erhaltene Wert eine Kraft pro Fläche ergab, die beim Zurückziehen der Rastersonde entstand, handelte es sich hierbei um eine Zugspannung mit der Einheit [Pa]. Die Standardabweichungen stammten aus den Mittelwerten für die maximalen Adhäsionskräfte der SCFS-Messungen sowie den aus diesen Kurven erlangten Zellhöhen und wurden unter Berücksichtigung der gegebenen Fehlerfortpflanzung bestimmt. Sämtliche im Histogramm dargestellten

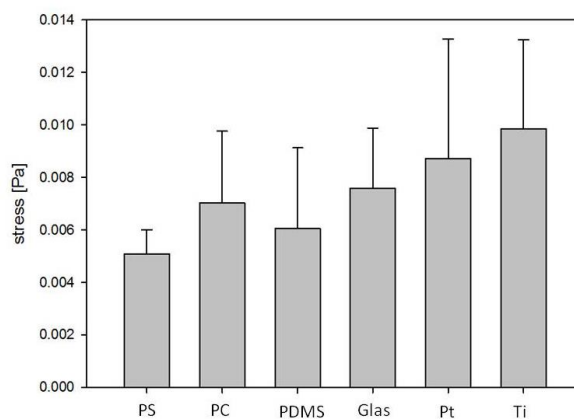


Abbildung 5.10: Zugbelastbarkeit [Pa] adhärenter Zellen bei 1 s Oberflächenkontakt (MW und SA).

Werte sind statistisch signifikant unterschiedlich und entstammten nicht derselben Grundgesamtheit (ANOVA-Analyse, $p < 0.001$). Dabei zeigten Zellen auf Polystyrol (PS) den niedrigsten Wert (0.0051 Pa \pm 0.005 Pa, MW \pm SA) und Titan den höchsten (0.0097 Pa \pm 0.001 Pa, MW \pm SA). Auffällig war, dass die Messungen auf Glas (0.0078 Pa) eine Art Grenze darstellte und kunststoffbasierte Materialien und Metalle in zwei Gruppen teilte. Diese Beobachtung war in der Messung der normierten maximalen Adhäsionskräfte noch deutlicher ausgeprägt (Abbildung 5.10).

Durch die Normierung der gemessenen Kräfte mit der Zellkontaktfläche, wurde ausgeschlossen, dass diese spezifische Adhäsion als Maß für die unterschiedlichen Zell-Grenzflächen-Wechselwirkungen ein Effekt der Größenvariation der jeweiligen Kontaktfläche war. Da es sich um gemittelte Werte handelte, war eine temporäre Häufung von Adhäsionsproteinen in dem der Oberfläche präsentierten Teil der Membran ebenfalls unwahrscheinlich. Da diese Faktoren auszuschließen waren, mussten den statistisch unterschiedlichen Werten Oberflächenparameter zu Grunde liegen, d.h. die spezifische Adhäsion ist substratabhängig. Hierfür können drei Gründe vorstellbar sein:

1. Durch unterschiedliche Gegebenheiten auf den jeweiligen Oberflächen findet auf ihnen eine nicht einheitliche Adsorption von EZM-Proteinen statt. Dadurch variiert die Konzentration der Proteine auf den Oberflächen, was auch eine unterschiedliche Konzentration der Reaktionspartner für Adhäsionsproteine in der Zellmembran zur Folge hat. Verschiedene Autoren gehen davon aus, dass die Adhäsionsstärke auf organismusfremden aber biokompatiblen Materialien hauptsächlich von der Fähigkeit dieser Materialien abhängt, auf ihrer Oberfläche Proteine zu binden (Galli et al., 2001; Lubarsky et al., 2005; Cai et al., 2006; Roach et al., 2006; Lord et al., 2010; Elter et al., 2011; Kabaso et al., 2011). So beeinflussen sie die Adhäsionsstärke (Roach et al., 2005; Elter et al., 2012) und, über die so geschaffene, Schnittstelle indirekt die Zellform (Lange et al., 2010; Matschegewski et al., 2010).
2. Durch unterschiedliche Gegebenheiten auf den jeweiligen Oberflächen (pK-Wert, Ladungsdichte, etwaige exozytotische Ausscheidung von adhäsionsbeeinflussenden Zellkomponenten, z.B. Spermidin) kommt es zu unterschiedlichen unspezifischen Wechselwirkungen zwischen der Zellmembran und der Oberfläche.
3. Die Variation der spezifischen Adhäsion ist substratspezifisch und abhängig von Oberflächenrauheit und bietet daher der Zelle mit steigender Rauheit eine größere effektive Oberfläche zur Adhäsion an.

Um den Einfluss einer oberflächenbedingten, unterschiedlichen Proteinadsorption zu untersuchen, müssten zusätzliche Studien durchgeführt werden. Das Bindungsverhalten oberflächenadsorbierter EZM-Proteine könnte durch eine bildgebende Studie mittels AFM bestimmt werden. AFM bietet als bildgebendes Verfahren (G. Binning et al., 1982) die Möglichkeit diese Proteine darzustellen und so einen Rückschluss auf die Organisation der EZM auf dieser Oberfläche zu ziehen. Diese Oberfläche müsste allerdings ideal glatt (typischerweise Glimmer) sein, da sonst ihr Höhenprofil und nicht die adsorbierten Proteine ausschlaggebend für das Messsignal wären. Elter et al. (2011) zeigten auf ihren strukturierten Titanoberflächen mittels Elisa (Yalow and Berson, 1960) und anschließender Fluoreszenzfärbung quantitativ die Proteinadsorption (Breme et al., 2008; Elter et al., 2009). Die Methode der Wahl stellt natürlich solch eine Fluoreszenzfärbung dar, da hier sämtliche Oberflächen direkt vermessen werden könnten und der Adsorptionsgrad in einem bildgebenden Verfahren sichtbar wäre.

Die Abhängigkeit der Zelladhäsion von anderen Oberflächenbeschaffenheiten (Ladung) ist an Hand dieses Versuchsdesigns nicht zu bestimmen. Ein Problem der Charakterisierung derartiger, meist chemischer Materialeigenschaften innerhalb dieses Versuchsdesigns ist, dass die Versuche in Flüssigkeit stattfinden und die meisten Methoden zur Klärung dieser Fragestellung nicht oder nur bedingt in Flüssigkeit durchführbar sind. Da das Zellmedium als die flüssige, grenzflächenüberschichtende Komponente des Versuchsaufbaus unterschiedliche Auswirkung auf die unterschiedlichen Materialien der Grenzfläche haben kann, sind Messungen ohne diese Komponente nicht repräsentativ für die zu charakterisierenden Vorgänge. Beispiele für diese Methoden sind die AFM-basierte Kelvin-Probe-Mikroskopie (Nonnenmacher et al., 1991) und die Kontaktwinkelmessung (Young, 1805) bzw. eine elektrophoretische Bestimmung von zerstoßenem Material der verwendeten Oberflächen (Lyons et al., 1981).

5.4.3 Oberflächennormierte Zelladhäsion muriner Fibroblasten (Abhängigkeit von der Oberflächenrauheit)

Um bei der Bestimmung der initialen Adhäsion vergleichbare Werte zu erlangen, wurde mit der effektiven Fläche der jeweiligen Oberflächen normiert. Dazu wurde für jedes verwendete Material ein topographischer Scan durchgeführt (Abbildung 5.11). Es wurde ein Normierungsquadrat bestimmt, das zelluläre Ausmaße besaß. Als Kantenlänge dieser Quadrate diente der durchschnittliche Zellradius der in diesen Messungen verwendeten Zellen ($10.00 \mu\text{m} \pm 1.56 \mu\text{m}$ MW und SA). Die effektive Fläche wurde in einem Graphikprogramm ausgewertet (Gwyddion 2.20, <http://gwyddion.net>). In Tabelle 3 sind die Werte für die jeweilige Rauheit und die der effektiven Flächen zusammengefasst.

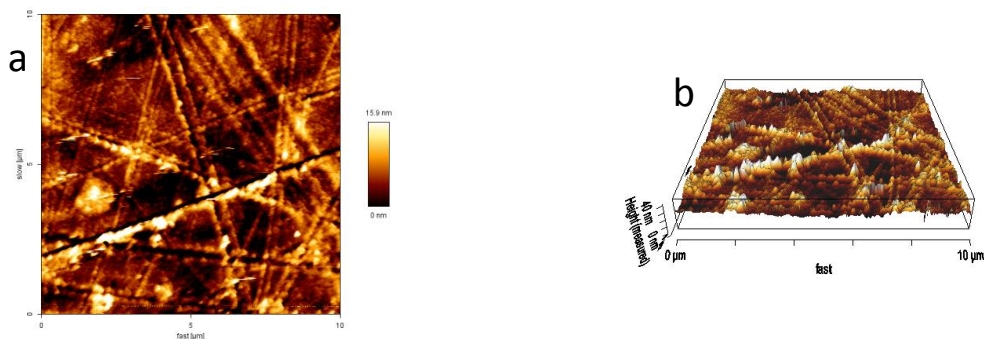


Abbildung 5.11: (a) Oberflächenscan einer Polystyroloberfläche. Contact Mode: 1V, Setpoint: 1V, Scanrate 1 Hz. (b) Darstellung derselben Oberfläche als 3D Konturbild.

Tabelle 3: Topographisch bestimmte Normierungsfaktoren. Die Normierungsfaktoren wurden aus 10 verschiedenen topografischen Scans erstellt (MW und SA).

Material	Oberflächenrauheit [nm]	effektive Fläche [μm^2]
Glas	0.3140 ± 0.0869	102.77 ± 1.59
PS	1.1340 ± 0.2137	105.52 ± 2.52
Titan	1.4730 ± 0.6949	101.00 ± 1.99
Platin	2.5500 ± 0.5644	100.45 ± 1.93
PDMS	4.2900 ± 2.0127	101.22 ± 1.94
PC	5.9200 ± 0.5653	101.62 ± 1.79

Die initiale Adhäsion konnte aus den Daten der SCFS-Messungen mittels des modifizierten Kelvin-Voigt-Modells theoretisch beschrieben werden. Es zeigte sich, dass die Zelle auf verschiedenen Grenzflächen bei gleicher zeitabhängiger Vergrößerung der Reaktionsfläche, substratspezifisch bindet. Es wurde bei passagenkonstanten Zellen einer Zelllinie (L929) darauf geachtet, dass die Zellen einen vergleichbaren Zellradius besaßen ($\approx 10 \mu\text{m}$). Der Zellradius wurde lichtmikroskopisch an Hand der Dimensionen der Rastersonde geprüft.

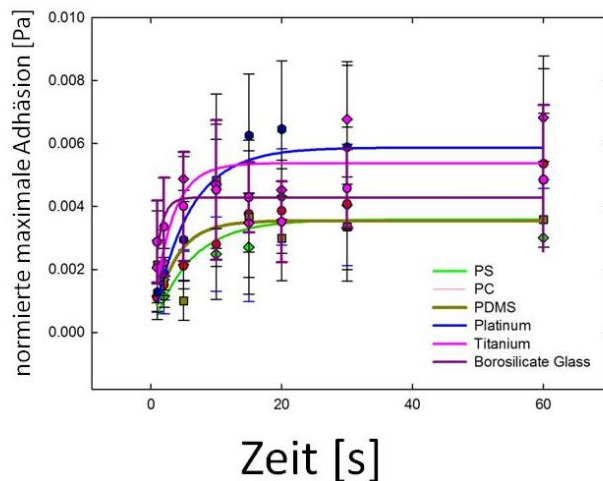


Abbildung 5.12: Adhäsionskinetik muriner Fibroblasten auf unterschiedlichen Oberflächen (oberflächennormiert, Kontaktkraft: 500 pN, 5 $\mu\text{m/s}$ Rückziehggeschwindigkeit, Durchschnittlicher Zellradius: 10 μm , MW und SA)

Um die Abhängigkeit der Adhäsion von der Oberflächenrauheit zu zeigen, wurden die Adhäsionsdaten auf den effektiven Oberflächen betrachtet. Dabei stellten sich folgende Fragen:

1. Besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Oberflächenrauheit und Adhäsion, d.h. ist die Variation der Adhäsionsstärke ein Rauheitseffekt?
2. Besteht ein weiterer Zusammenhang, der materialspezifisch ist und einen rauheitsbedingten Effekt überlagert oder sogar ausschließt?

Die Kurven in Abbildung 5.12 streben gegen ein Maximum. Da es sich bei der y-Achse um eine Einheit handelt [Pa], die aus einer Kraft hergeleitet ist, besitzt die Konstante C' ebenfalls diese Einheit [Pa]. Wie schon in den druckflächennormierten Kurven in Abbildung 5.10, teilen sich die Adhäsionswerte der einzelnen Oberflächen quasi materialabhängig in Gruppen, wobei das Glas diese Gruppen teilt. Die Grenzwerte, d.h. die Maximalwerte, die während der initialen Adhäsion erreicht werden können, sind durch die Konstanten der jeweiligen Funktion für die jeweilige Oberfläche bestimmt (C' und C''). Ähnliche Zahlenwert wurden für $C' \cdot A$ für $t \rightarrow \infty$ Gruppe (Pt, Ti) $\approx 0.005 - 0.006 \text{ Pa}$, Glas $\approx 0.004 \text{ Pa}$, (PDMS, PC, PS) $\approx 0.0034 \text{ Pa}$ (MW) gefunden. Die Daten zeigten, dass eine unterschiedliche Oberflächenrauheit nicht allein verantwortlich für eine verstärkte Adhäsionsstärke sein kann. Dieser Effekt ist also entweder den unspezifischen Wechselwirkungen der Oberflächen oder dem Grad der Proteinadsorption zuzuschreiben (siehe oben).

Tabelle 4: Maximale oberflächennormierte Adhäsionswerte, die aus Abbildung 5.12 bestimmt wurden (MW und SA).

Material	Rauheit [nm]	max. Adhäsionsstärke (60 s) [Pa]
Glas	0.3140 ± 0.0869	0.004 ± 0.002
PS	1.1340 ± 0.2137	0.003 ± 0.001
Titan	1.4730 ± 0.6949	0.005 ± 0.001
Platin	2.5500 ± 0.5644	0.006 ± 0.002
PDMS	4.2900 ± 2.0127	0.003 ± 0.001
PC	5.9200 ± 0.5653	0.003 ± 0.001

In Tabelle 4 wurden die Rauheitsfaktoren der einzelnen Oberflächen aufgeführt. Ein Vergleich der Rauheitsfaktoren mit den jeweiligen Adhäsionskräften zeigte keinen direkten Zusammenhang zwischen der Oberflächenrauheit und der Adhäsionsstärke. Die maximale Adhäsionsstärke wurde auf Pt erreicht ($0.006 \text{ Pa} \pm 0.002 \text{ Pa}$, MW \pm SA) geringe vergleichbare Werte ergaben sich bei PC, PS und PDMS ($0.003 \text{ Pa} \pm \text{nN}$, MW \pm SA). Die Fläche, die den geringsten Rauheitsfaktor zeigte war Glas ($0.3140 \text{ nm} \pm 0.0869 \text{ nm}$, MW \pm SA) und die stärkste PC ($5.9200 \pm 0.5653 \text{ nm}$). Zwar adhärten L929-Zellen auf der ebenen Glasfläche mit der geringsten Kraft. Jedoch zeigten sie auf PC nicht die stärkste Adhäsion.

Eine direkte Abhängigkeit der initialen Adhäsion von Rauheitsfaktoren konnte nicht gezeigt werden, obwohl verschiedene Autoren diesen Faktor diskutieren (Hallab et al., 1995, 2001; Boyan et al., 1996; Lampin et al., 1997; Degasne et al., 1999; Anselme, 2000; Anselme et al., 2000; Deligianni et al., 2000; Chung et al., 2003; Price et al., 2004; Huang et al., 2004; Lüthen et al., 2005; Ranella et al., 2010). Jedoch wurden in der derzeitigen Literatur zwei grobe methodische Richtungen beobachtet. Entweder die Autoren diskutieren Zelladhäsion in Abhängigkeit der Oberflächenrauheit, indem sie einheitliche Materialien mit unterschiedlichen Rauheitsfaktoren untersuchen oder sie betrachten zusätzliche chemische und/oder elektrochemische Eigenschaften, z.B. die Oberflächenladung oder funktionelle Gruppen. Die Variation der Oberflächenrauheit auf Materialien wie Ti (Anselme et al., 2000; Deligianni et al., 2000; Huang et al., 2004), das in Knochen vorkommende Hydroxylapatit (Deligianni et al., 2000) oder verschiedenen Kunststoffen (Chung et al., 2003; Price et al., 2004) hatte bei sämtlichen Autoren einen Einfluss auf die Zelladhäsion. Es konnten ein besseres Ausbreiten der Zelle und anschließend ein höheres Zellwachstum beobachtet werden und die initiale Adhäsion war verbessert. Auch andere

Faktoren wurden durch eine Erhöhung der Rauheit positiv beeinflusst, so dass eine Variation der Bioverträglichkeit in Abhängigkeit der Oberflächenrauheit gegeben war. Übereinstimmend berichteten alle Autoren über eine höhere Adhäsion der EZM-Proteine (FN, Vinkulin, Vitronektin oder verschiedene Kollagene) bzw. von Adhäsionsfaktoren (z.B. bestimmte Untereinheiten verschiedener Integrine) an eine auf den jeweiligen Oberflächen vorhandene EZM. Bei einer Betrachtung zusätzlicher Faktoren wie der Oberflächenenergie (Lampin et al., 1997; Hallab et al., 2001; Ranella et al., 2010) oder der Oberflächenladung (Hallab et al., 1995) erlangten die Autoren grundsätzlich einen Zusammenhang, der zu einem ähnlichen Ergebnis führte. Sowohl für variierende Oberflächenladungsdichten als auch wechselnde Oberflächenenergien wurde ein Zelladhäsionsmaximum beobachtet. Sämtliche Autoren führten dies auf eine optimierte EZM-Proteinadhäsion unter diesen Bedingungen zurück. Zusätzlich wurde von Elter et al (2012) eine topographieabhängige FN-Adsorption von definierten Strukturen mittels SCFS bestimmt. Eine theoretische Arbeit, die mittels Simulation die brownischen Molekularbewegungen des Proteins Lysozym in einem Kraftfeld bestimmt, kommt zu demselben Ergebnis (Elter et al., 2011).

Die oben aufgeführten Ergebnisse sowie das Studium der angeführten Literatur könnten den Leser zu dem Schluss verleiten, das verstärkte Zelladhäsion auf biokompatiblen Materialien erwünscht ist. Das ist natürlich bei der Integration von Implantaten eindeutig der Fall. Besonders in der Zahnmedizin und in der osteointegrativen Endoprothetik wird nach funktionalisierten Oberflächen gesucht, die ein Einwachsen fördern bzw. begünstigen und die Verweildauer des Implantats im menschlichen Körper verlängern. Jedoch existieren auf solchen Implantaten auch Bereiche, z.B. in funktionellen Bereichen künstlicher Gelenke, an denen ein erhöhter Zellwuchs eher unerwünscht ist. Darüber hinaus wird die Integration in der Endoprothetik durch die Konkurrenzsituation zwischen Mikroorganismen und körpereigenen Zellen zusätzlich erschwert. Das sogenannte „Race to the Surface“ führte zu der Entwicklung von Oberflächen, die zumindest für Mikroorganismen eine weniger einladende Umgebung bereitstellen (van Loosdrecht et al., 1990).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Fibroblasten auf unterschiedlichen Oberflächen ein ähnliches mechanisches Verhalten zeigen. Ihre zytomechanischen Eigenschaften verhielten sich auf sämtlichen Oberflächen gleich. Dies konnte anhand einer Kurvenanpassung an die Daten statistisch signifikant gezeigt werden. Platin vermittelte unter all den verwendeten Materialien die stärkste Adhäsion und Polystyrol die schwächste. Glas stellte quasi den Übergang zweier Gruppen dar und zog eine Grenze zwischen zwei Adhäsionsstärkenklassen. So lieferten die Metalle Pt und Ti einen starken Adhäsionsuntergrund und die untersuchten Kunststoffe zeigten sich adhäsionsschwachen.

6 Zusammenfassung

Es war das Ziel der Arbeit, die Schnittstelle zwischen Zellen und artifiziellen Oberflächen zu charakterisieren. Um ein umfassendes Bild der Vorgänge während der Ausbildung dieser Schnittstelle zu zeichnen, unterteilt sich die vorliegende Arbeit in drei Teile, die zu den sukzessiven Schritten der initialen Zellanbindung an eine Oberfläche korrespondieren.

Der erste Teilaspekt untersucht die Überwindung der gegenseitigen elektrostatischen Abstoßung bei der Annäherung gleichnamig geladener Oberflächen (im biologischen System der negativ geladenen Zell- und artifiziellen Oberflächen) anhand des Modellsystems Borosilikat und Muskovit. Die Gegenwart des in biologischen Systemen ubiquitären Spermidins vermittelt in Abhängigkeit vom Protonierungsgrad eine Anziehung zwischen den Oberflächen. Die Messungen zeigen so anhand desselben organischen Ions die Abhängigkeit von Ionenkondensation und Ionenkorrelation von der Ionenladung. Die pH-Abhängigkeit der gemessenen kraftspektroskopischen Kurven zeigt, dass die Anziehungskraft der Gleichgewichtslage der unterschiedlich protonierten Spermidin-Spezies folgt und die attraktiven Kraftwirkung für pH-Werte kleiner 7.5 im Einklang mit Literaturdaten verschwindet.

Der zweite Teilaspekt charakterisiert die destabilisierende Wirkung des Polysaccharids Heparin auf das EZM-Protein FN, das eine hochspezifische Bindungsstelle zur Zelladhäsion besitzt. Heparin verringerte die in SMFS Messungen festgestellte Kraft zur Entfaltung von FN. In Anwesenheit von Heparin verbreiterte sich die Konturlängenverteilung des FN symmetrisch um ihren Mittelwert, was den destabilisierenden Heparin-Einfluss zeigt. Diese Ergebnisse eröffnen neuartige Interpretationsmöglichkeiten der Rolle der Kommunikationswege innerhalb des FN bei der Zelladhäsion.

Der dritte Aspekt der vorliegenden Arbeit charakterisiert das mechanische Verhalten sowie die Adhäsionsstärke muriner Fibroblasten auf unterschiedlichen Oberflächen. Obwohl die mechanischen Eigenschaften der Zellen nicht durch die unterschiedliche Beschaffenheit der untersuchten Oberflächen beeinflusst wurden, variierte ihre Adhäsionsstärke in Abhängigkeit von den Materialien. Dabei vermittelten die metallischen Werkstoffe Ti und Pt die höchsten, die Kunststoffe Polykarbonat, PDMS und Polystyrol die niedrigsten Adhäsionsstärken. Da das adhäsionsschwächste Material Polystyrol zur Herstellung von Zellkulturschalen verwendet wird, kann angenommen werden, dass auf sämtlichen untersuchten Oberflächen eine gute Zellanbindung möglich ist.

7 Ausblick

Die Zell-Oberflächen-Schnittstelle steht seit einigen Jahren im Fokus der interdisziplinären Forschung. Eine Vertiefung bereits bestehenden Wissens stellt eine Herausforderung an viele Forschergenerationen dar, was sich auch an den aussagekräftigen Ergebnissen der vorgelegten Arbeit widerspiegelt. Meine Studien sollten in erster Linie als Grundlage für tiefergehende, grundlegende Charakterisierung zellulärer Adhäsionsmechanismen dienen.

So könnten die durch Spermidin vermittelten attraktiven Kräfte zusätzlich in Lösungen höherer Ionenstärke untersucht werden. Zu testen wäre beim Konstanthalten aller weiteren Faktoren eine Variation der Debye-Länge. Der dargelegten Theorie nach müsste z.B. durch eine Variation der Ionenstärke der Lösungen eine Abhängigkeit der attraktiven Wechselwirkungen zweier gleichgeladener Oberflächen existieren.

Zur näheren Charakterisierung der spezifischen Oberflächenadhäsion von Zellen durch EZM-Proteine sollten auf jeden Fall rekombinante Proteine herangezogen werden. Die Sequenzen für FN III10 sind seit längerem bekannt und können in molekularbiologischen Versuchen angewendet werden. Entsprechende Vorversuche liegen vor und die Ergebnisse stehen zur Verfügung.

Für SCFS-Versuche wäre es interessant, einige der Teilversuche (unspezifisch vermittelte Adhäsion und Variation der Adhäsionsstärke durch spezifische Bindungen) mit der SCFS zu kombinieren. So könnte untersucht werden, ob Spermidin eine stärkere Zelladhäsion vermittelt. Zelladhäsionsstudien mit rekombinanten Proteinen könnten zeigen, wie die interdomänale Kommunikation in FN wirkt. Vorstellbar wären z.B. Zelladhäsionsstudien mit drei verschiedenen rekombinanten Proteinen. Das erste würde nur die FN III10 Domäne enthalten, das zweite kombinierte die FN III10 Domäne mit einer FN III9 Domäne und das dritte enthielte eine durch ein drittes, für die Adhäsion funktionsloses Modul getrennte FNIII 9 Domäne und eine FNIII 10 Domäne. Da die interdomänale Kommunikation zwischen diesen Domänen für die Zelladhäsion von Fibroblasten bedeutend ist, ergäbe dieser Versuchsansatz interessante Ergebnisse.

8 Anhang

1.1 Abkürzungsverzeichnisse

1.1.1 Poisson-Boltzmann-Gleichung

a	Aktivität
c_{∞}	Ionenkonzentration im Ensemble
d	Abstand der Ladungen auf der Kugeloberfläche
D	Spaltbreite
δ	Dicke der Helmholtzschicht
e	Elementarladung
ε	Permittivität
ε_0	Elektrische Feldkonstante
E	Elektrische Feldstärke
E_0	Grundverteilung der Feldstärke
E_S	Elektrische Feldstärke der Oberfläche
E_j	Energie des Zustandes j
f_1, f_2, f_3, f_4	Faktor des Kraftbeitrages der de-, mono-, di- und triprotonierten Spermidinspezies zur Gesamtkraft
F_{rel}	Gesamtkraft
g_j	Entartungsgrad des Zustandes j
H	Wasserstoff
I	Ionenstärke
K_1, K_2, K_3	Gleichgewichtskonstanten
κ	Inverse Debye-Länge
k_B	Boltzmann-Konstante
λ_B	Bjerrum-Länge
λ_D	Debye-Länge

μ	chemisches Potential
N_A	Avogadro-Konstante
N	Gesamtteilchenzahl
N_0	Teilchenzahl im Grundzustand
N_j	Gesamtteilchenzahl
p	Repulsiver Druck
P_j	Wahrscheinlichkeit des Zustandes j
ϕ	Elektrisches Potential
ϕ_δ	Elektrisches Potential bei Dicke der Helmholtzschicht
ϕ_0	Elektrisches Potential der Oberfläche
Q	Ladung
R	Radius der Kugel
ρ	Ionendichte
ρ_0	Grundverteilung der Ionendichte
ρ_S	Ionendichte der Oberfläche
ρ_∞	Ionenverteilung im Ensemble
ρ_{xi}	Ionenverteilung am Punkt x_i
σ	Oberflächenladungsdichte
SP	Symbol des Spermidinmoleküls
T	absolute Temperatur
v	Molares Volumen
w	Coulomb-Energie
x	Ortsvariable
x'	Bezugsvariable
z	Valenz der Ionen
Z	Zustandssumme

8.1.1 Mechanik

a	Durchmesser der Kontaktfläche
A, B	Geometrieabhängige Parameter
α, β, θ	Winkel
Δd	Längenänderung senkrecht zur wirkenden Kraft
d_0	Ursprüngliche Länge senkrecht zur wirkenden Kraft
d_1, d_2	Größe der Vertiefungen
δ_1, δ_2	Größe der Kompressionen
η	Dämpfungskonstante
E	Elastizitätsmodul
ϵ	Dehnung/Längenänderung
ϵ_{quer}	Relative Änderung senkrecht zur wirkenden Kraft
F_1, F_2	Kraft auf Feder bzw. Dämpfer
F_n	Normalkraft
F_t	Tangentialkraft
G	Schubmodul
γ	Winkel
h	Abstand
K	Kompressionsmodul
κ	Kompressibilität
l_0	Gesamtlänge
Δl	Längenänderung
μ	Poisson-Zahl

p	Druck
p_0	Ausgangsdruck
p_m	Mittlerer Druck
p_1, q_1	Proportionalitätskonstanten der Standardform
r	Punkt innerhalb von a
R	Radius
R', R''	Radien der Hauptkrümmungen in x- und y-Richtung
S_1, S_2	Punkte
σ	Spannung
t	Zeit
T_1, T_2	Distanzmarken
τ	Scherung
ϑ	Relative Volumenänderung
ΔV	Volumenänderung
V	Volumen
u_{z1}, u_{z2}	Betrag der Verformung
x, x_1, x_2	Gesamtlänge, Grundlängen von Feder und Dämpfer
$\Delta x, \Delta x_1, \Delta x_2$	Änderungen der Grundlängen
x, y, z	Kartesische Koordinaten

8.1.2 Anhang: Poisson-Boltzmann-Gleichung

Die abstandsabhängige effektive Kraft zweier gleichgeladener Oberflächen, z.B. zwischen den experimentell verwendeten Materialien Muskovit und Borosilikat, entsteht als Zusammenspiel verschiedener Kräfte (Israelachvili and Adams, 1978). Neben den allgegenwärtigen van der Waals Kräften, d.h. Kräfte kurzer Reichweite, determinieren vor allem elektrostatische Kräfte langer Reichweite die Wechselwirkung solcher Oberflächen. Zwei geladene Teilchen erfahren unter physiologischen Bedingungen attraktive van-der-Waals-Kräfte (Israelachvili, 2011). Diesen attraktiven Kräften wirken repulsive, elektrostatische Kräfte entgegen. Die resultierende Kraft aus den Wechselwirkungen ist bei einer Distanz $>5\text{nm}$ in wässrigen Elektrolytlösungen repulsiv. Bei einer Beschreibung attraktiver Nettokräfte zwischen zwei gleichgeladenen Oberflächen, bzw. Teilchen, in Lösungen hoher Permittivität, wie z.B. Wasser, muss zur theoretischen Beschreibung vor allem die abstandsabhängige Änderung der elektrostatischen Kräfte betrachtet werden. Solvatisierung und sterische Kräfte sind weitere Ursachen für intermolekulare Kräfte, welche realen Systemen eine höhere Komplexität verleihen. Diese Wechselwirkungen werden bei der Dateninterpretation vernachlässigt.

Die Boltzmann-Verteilung

Die Boltzmann-Verteilung (oder Gibbs-Boltzmann-Verteilung) gibt die Energieverteilung über die Einzelsysteme eines kanonischen Ensembles an (Göpel and Wiemhöfer, 2000; Meschede, 2004). Allgemein kann mittels der Boltzmann-Verteilung die Wahrscheinlichkeit P eines energetischen Zustandes als

$$P_j = \frac{1}{Z} g_j \exp\left[-\frac{E_j}{k_B T}\right] \quad \text{Gl. 8.1}$$

angegeben werden. Dabei ist Z die Zustandssumme, g_j der Entartungsgrad des Zustandes j , E die Energie des Zustandes j , k_B die Boltzmann Konstante und T die absolute Temperatur. Die Boltzmann Verteilung kann mit der Teilchenzahl N_j ausgedrückt werden.

$$N_j = N_0 g_j \exp\left[-\frac{E_j}{k_B T}\right] \quad \text{Gl. 8.2}$$

Wobei N_0 die Gesamtteilchenzahl im Grundzustand angibt. Bei dieser Art Darstellung muss zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit P , dass ein Teilchen N einen energetischen Zustand j einnehmen kann, mit der Zustandssumme Z normiert werden. Da die Zustandssumme Z die Gesamtheit aller

energetischen Zustände ist, stellt sie in der Teilchendarstellung die Gesamtteilchenanzahl der Teilchen aller möglichen Zustände (N) dar. Für die Wahrscheinlichkeit eines Zustandes P_j ergibt sich

$$P_j = \frac{N_j}{N} \quad \text{Gl. 8.3}$$

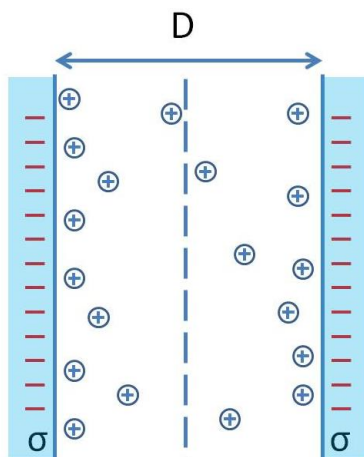
Mit Hilfe der Boltzmann-Verteilung kann das Verhältnis von Teilchen aus den energetisch unterschiedlichen Zuständen der Population N_1 und N_2 in berechnet werden (Wagner, 2010), wobei bei der beispielhaften Berechnung von $g_j = 1$ ausgegangen wird. Die zwei energetisch unterschiedlichen Zustände $j = 1, 2$ ergibt sich für das Verhältnis der Wahrscheinlichkeiten der Zustände:

$$\frac{p_2}{p_1} = \frac{N_2 N}{N_1 N} = \frac{N_2}{N_1} \quad \text{Gl. 8.4}$$

Die Boltzmann-Verteilung wird im weiteren Verlauf benötigt, um die Ionenverteilung im Spalt zweier sich nähernden planparalleler Oberflächen zu beschreiben.

Die Poisson-Gleichung

Bei der Betrachtung unterschiedlich geladener Teilchen entstehen interionische elektronische



Wechselwirkungen. Um diese Wechselwirkung darzustellen, wird das von einer Ladungsverteilung erzeugte elektrische Potential φ um ein Zentralion mit Ionenwolke betrachtet, wobei φ einen ortsabhängigen Gradienten aufweist. Für die Feldstärke E gilt:

Abbildung 8.1: Durch eine Distanz D getrennte negativ geladene Oberflächen und ihre Gegenionen in wässriger Lösung (modifiziert nach Israelachvili, 2011).

$$E = -\frac{d\varphi}{dx} \quad \text{Gl.8.5}$$

Liegt mit ρ eine Ionendichte vor, die selber eine Funktion des Ortes ist, ergibt sich eine daraus erzeugte ortsabhängige Feldstärke mit einer Valenz z der Ionen und einer Elementarladung e

$$\frac{dE}{dx} = \frac{ze\rho}{\varepsilon_0\varepsilon} \quad \text{Gl.8.6}$$

Gl.8.5 und Gl.8.6 können zur eindimensionalen Poisson-Gleichung kombiniert werden (Hamann and Vielstich, 2005).

$$\left(\frac{d^2\varphi}{dx^2} \right) = \frac{ze\rho}{\varepsilon_0\varepsilon} \quad \text{Gl. 8.7}$$

Befinden sich lediglich die Gegenionen der jeweiligen Teilchen in der Lösung, wird das chemische Potential durch (Israelachvili, 2011)

$$\mu = ze\varphi + k_B T \ln \rho \quad \text{Gl. 8.8}$$

beschrieben. Bei der Anwendung der gezeigten Gleichungen (Gl. 8.1 – Gl. 8.8) zur Beschreibung der Wechselwirkung zwei gleich geladener Oberflächen (Abbildung 8.1) müssen zuerst eine wenige Randbedingungen gesetzt werden. Da nur Potentialunterschiede physikalisch interessant sind, wird auf halben Weg ($x = 0$) zwischen den planar parallelen Oberflächen $\phi_0 = 0$ gesetzt. Das gleiche gilt für die elektrische Feldstärke ($d\phi/dx = 0$). Die Ionenkonzentration entspricht an diesem Ort der Ionendichte des Ensembles ($\rho = \rho_0$). Für die Boltzmann-Verteilung der Ionen gilt für den Spalt zwischen den Oberflächen.

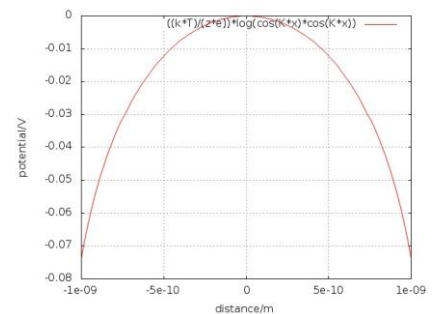


Abbildung 8.2: Potentialverlauf im Spalt der Breite D zwischen zwei negativ geladenen Oberflächen

$$\rho = \rho_0 \exp \left[-\frac{ze\varphi}{k_B T} \right] \quad \text{Gl. 8.9}$$

Gl. 8.7 kann wiederum mit Gl. 8.9 zur Poisson-Boltzmann Differentialgleichung kombiniert werden (Meschede, 2004; Hamann and Vielstich, 2005; Israelachvili, 2011).

$$\frac{d^2\varphi}{dx^2} = -\frac{ze\rho}{\varepsilon_0\varepsilon} = -\frac{ze}{\varepsilon_0\varepsilon} \exp\left[-\frac{ze\varphi}{k_B T}\right] \quad \text{Gl. 8.10}$$

Gelöst ergibt sich aus Gl. 8.10 für jeden Abstand der Flächen x im Spalt zwischen den Oberflächen das Potential φ , die elektrische Feldstärke E und eine Verteilungsfunktion für die Gegenionendichte ρ (Meschede, 2004; Israelachvili, 2011). Aus der Poisson-Boltzmann-Gleichung kann etwa durch das geschickte Setzen von Randbedingungen (Elektroneutralität und $E_0 = (d\varphi/dx)_0 = 0$) die Oberflächenladungsdichte σ der jeweiligen Oberfläche bestimmt werden. Da das System aus zwei gleichgeladenen Oberflächen besteht, entspricht σ dem in Abbildung 8.1 gezeigten Integral über der Mitte des Spalts ($x = 0$) bis zur Oberfläche ($x = D/2 = S$). Der Integrationsschritt, aus dem σ hervorgeht, entspricht dem Integral über der Ladungsdichteverteilung auf der rechten Seite der Gl. 8.11. Die Integration über der rechten Seite ergibt die elektrische Feldstärke an den Oberflächen.

$$\sigma = -\int_0^{D/2} ze\rho = +\varepsilon_0\varepsilon \int_0^{D/2} \left(\frac{d^2\varphi}{dx^2}\right) dx = -\varepsilon_0\varepsilon \left(\frac{d\varphi}{dx}\right)_{D/2} = -\varepsilon_0\varepsilon \left(\frac{d\varphi}{dx}\right)_S = -\varepsilon_0\varepsilon E_S \quad \text{Gl. 8.11}$$

Die Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung unter den gewählten Randbedingungen (Gl. 8.12) stellt einen Zusammenhang zwischen der Oberflächenladungsdichte und der Feldstärke an den Oberflächen her (Israelachvili, 2011):

$$E_S = -\frac{\sigma}{\varepsilon_0\varepsilon} \quad \text{Gl. 8.12}$$

Abbildung 8.2 zeigt den Potentialverlauf im Spalt. Auch diese Funktion ist eine Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung unter physikalisch sinnvollen Randbedingungen ($d\phi/dx = 0$ für $x = 0$). So kann

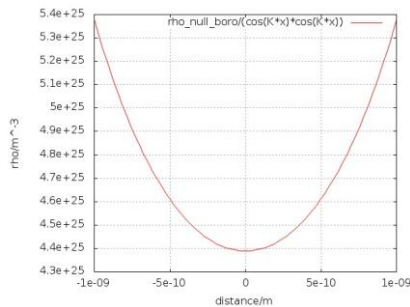


Abbildung 8.3: Ionenkonzentration im Spalt der Breite D zwischen zwei negativ geladenen Oberflächen

auf die Ionenverteilung im gesamten Spalt geschlossen werden (Abbildung 8.3). Es stellt sich heraus, dass die repulsive elektrostatischen Wechselwirkungen und die entropische Mischung der Ionen der ortsabhängigen Ionenverteilung $\rho(x)$, das Potentialprofil $\phi(x)$ und den Verlauf der Feldstärke $E(x)$ bestimmen.

$$\rho_x = \rho_0 + \frac{\varepsilon_0 \varepsilon}{2k_B T} \left(\frac{d\phi}{dx} \right)_x^2 \quad \text{Gl. 8.13}$$

In einem ionenlosen Spalt entsteht zwischen den Oberflächen gleichen Potentials kein elektrisches Feld $|\vec{E}| = 0$, da sich die Oberflächenpotentiale gegenseitig auslöschen. Werden in diesen Spalt Ionen eingeführt erfahren sie demnach keine attraktiven Kräfte, die sie zu einer der beiden Oberflächen hinziehen. Die anfängliche Verteilung der gleichgeladenen Ionen ist daher rein entropischer Natur bzw. wird durch die gegenseitige elektrostatische Abstoßung realisiert.

Überführt man ein anfänglich elektrisch neutrales Tonmineral wie Glimmer in eine wässrige Lösung, beginnt es zu quellen. Durch diesen Vorgang öffnen sich zwischen den Schichten des Materials Spalten. Die die Oberfläche neutralisierenden Ionen beginnen, entgegen der Coulomb-Kraft, die zur Oberfläche gerichtet ist, zu dissoziieren. Durch diese entropische Mischung der Gegenionen entsteht letztendlich die elektrochemische Doppelschicht, die die gegenseitige Abstoßung gleich geladener Oberflächen bewirkt. Die gegenseitige Abstoßung solcher Oberflächen ist demnach entropisch bedingt (Israelachvili, 2011).

Elektrochemische Doppelschicht

Das einfachste Modell das diese Wechselwirkungen an der Schnittstelle einer geladenen Oberfläche und einer Elektrolytlösung beschreibt ist das Helmholtzmodell (Helmholtz, 1853). Helmholtz nahm an, dass sich an eine geladene Oberfläche Gegenionen anlagern, die gemeinsam mit den Ladungen der Oberfläche eine starre Doppelschicht bilden. Da in dieser Schicht der Dicke δ eine klare Ladungstrennung herrscht, besitzt sie kapazitive Eigenschaften und wird in der Theorie modellhaft durch einen Plattenkondensator beschrieben. Da innerhalb der Helmholtzschicht keine Abschirmung,

d.h. eine konstante Permittivität ϵ_δ , der Ionenladung durch Gegenionen herrscht, ist der Potentialabfall in diesem Bereich linear und proportional zur Dicke der Helmholtzschicht.

$$\varphi_\delta = \frac{\sigma \delta}{\epsilon_0 \epsilon} \quad \text{Gl.8.14}$$

Später führten Louis Georges Gouy (1910) und David Chapman (1913) eine Verfeinerung der

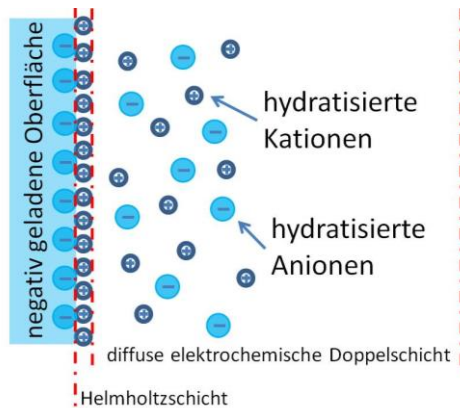


Abbildung 8.4: Sternmodell mit der starren elektrochemischen Doppelschicht (Helmholtzschicht) und der diffusen elektrochemischen Doppelschicht (modifiziert nach Gongadze et al. 2010)

Helmholtztheorie ein. Sie postulierten eine diffuse Schicht hydratisierter Gegenionen. Diese Ionen bilden die diffuse elektrochemische Doppelschicht, innerhalb derer das elektrische Potential exponentiell abnimmt. In diesem Modell kombinierten Gouy und Chapman erstmals das Zusammenspiel elektrostatisch attraktiver Kräfte zwischen Ionen gegensätzlicher Ladung und repulsive entropische Kräfte, die auf Brownscher Molekularbewegung beruhen. Beide Modelle haben ihre Vorteile in den jeweiligen Grenzfällen: Versagt die diffuse Gouy-Chapman Schicht exakte

Voraussagen bei Lösungen starker Ionenstärke, zeigen impedanzspektroskopische Messungen, dass solche Lösungen nahezu einem perfekten Kondensator gleichen. Stern folgte diesem Gedanken, indem er eine Kombination beider Modelle vorschlug (Abbildung 8.4). Erweiterungen und Verfeinerung des Stern-Modells, wie z.B. eine örtliche Variation der Permittivität in Abhängigkeit von der Entfernung zur geladenen Oberfläche, werden in der gegenwärtigen Literatur diskutiert (Gongadze et al., 2010). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass wir über der starren Schicht einen linearen Potentialabfall beobachten, der proportional zur Breite der Helmholtzschicht ist und in einer diffusen Schicht, mit einer höheren Ionenkonzentration gegenüber dem Ensemble, ein exponentieller Potentialabfall vorherrscht, der der Poisson-Boltzmann-Theorie gehorcht (Kilic et al., 2007).

Die Graham-Gleichung

Biologische Objekte befinden sich in der Regel in Elektrolytlösungen. Die bisher diskutierten Randbedingungen für die Poisson-Boltzmann-Theorie geben allerdings eine Lösung vor, in der lediglich die Gegenionen der geladenen Oberflächen zugegen sind. Das trifft für physiologische Umgebungen nicht zu. Um eine derartige Situation zu beschreiben, muss die Poisson-Boltzmann-Gleichung erweitert werden und es sollten auch verschiedene Ionen unterschiedlicher Valenz in Betracht gezogen werden.

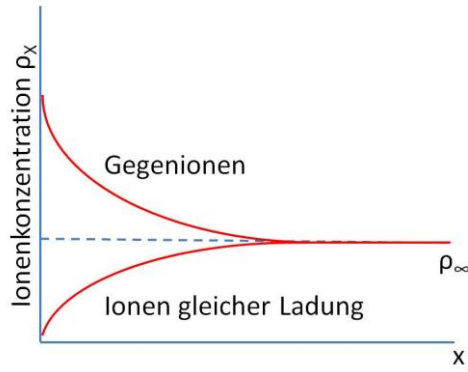


Abbildung 8.5: Ionenverteilung in der Nähe geladener Oberflächen in Elektrolyten (modifiziert nach Israelachvili, 2011).

Eine geladene Oberfläche in einer Ionenlösung mit verschiedenen Ionen der Valenz $z = 1$ zeigt ein Verteilungsprofil, das eine Akkumulation von gegensätzlich zur Oberflächenladung geladenen Ionen an der Oberfläche vorliegt. Im Gegensatz dazu ist in der Nähe der Oberfläche eine Verarmung von gleichgeladenen Ionen zu beobachten (Abbildung 8.5). Im Gegensatz zu den bisherigen Betrachtungen der Poisson-Boltzmann-Gleichung befindet sich die Schnittstelle zwischen der geladenen Oberfläche und dem Elektrolyten bei $x = 0$ und nicht in der

Mitte des Spalts zwischen den geladenen Oberflächen. Alle unter 0 benutzten Gleichung sind auch auf andere Ionen der Valenz z_i anwendbar. Das ergibt für die Boltzmannverteilung (Israelachvili, 2011):

$$\rho_{xi/0i} = \rho_{\infty i} \exp \left[-\frac{z_i e \phi_{xi/0i}}{k_B T} \right] \quad \text{Gl. 8.15}$$

wobei ρ_{∞} die Ionenkonzentration im Ensemble, $\rho_{xi/0i}$ die Ionenverteilung am Punkt x (x_i) bzw. an der Oberfläche ($0i$) und $\phi_{xi/0i}$ die jeweiligen Potentiale an dieser Stelle sind. Die Oberflächenladungsdichte ist über die Grahame-Gleichung (Grahame, 1953) mit der Ionenverteilung an der Oberfläche ρ_0 verknüpft (Israelachvili, 2011):

$$\sigma = \sqrt{8c_{\infty} \varepsilon_0 \varepsilon k_B T} \sinh \left(\frac{ze\phi_0}{2k_B T} \right) \quad \text{Gl. 8.16}$$

wobei c_{∞} die Ionenkonzentration im Ensemble ist.

Debye-Länge

Eine klassische Größe, die das Ausmaß der diffusen Schicht charakterisiert, ist die Debye-Länge (Abbildung 8.6). Die Debye-Länge ist derjenige Wert, bei dem das elektrische Potential einer lokalen Überschussladung, in unserem Beispiel eine von der elektrochemischen Doppelschicht abgeschirmte Ladung auf der Oberfläche, auf das 1/e-fache abfällt (Abbildung 8.6). Für geringe Oberflächenpotentiale ($< 25\text{mV}$) gilt (Israelachvili, 2011):

$$\sigma = \varepsilon_0 \varepsilon_K \varphi_0 \quad \text{Gl. 8.17}$$

mit κ definiert durch

$$1/\kappa = \lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_K T}{2N_A e^2 I}} \quad \text{Gl. 8.18}$$

Durch eine Entwicklung des \sinh aus Gl. 8.16 in einer Taylorreihe bis nach dem zweiten Glied, ergibt sich Gl. 8.17, die für Oberflächen mit kleinen Potentialen gültig ist.

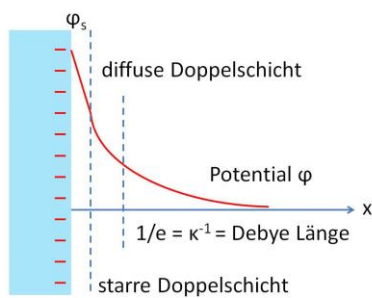


Abbildung 8.6: Abfall des Potentials über der elektrochemischen Doppelschicht bei einem Sternmodell (modifiziert nach Israelachvili, 2011).

Mit I der Ionenstärke, λ_D der Debye-Länge; N_A der Loschmidt-Zahl oder Avogadro-Konstante. Vergleicht man Gl.8.14 und Gl. 8.17, zeigt sich, dass das elektrische Potential φ_0 proportional zur Oberflächenladungsdichte σ ist. Gl. 8.17 stellt einen Kondensator dar, dessen Platten die Distanz $1/\kappa$ aufweisen. Diese Analogie zur Helmholtztheorie, führte zu dem Namen diffuse Doppelschicht. An Gl. 8.18 ist zu erkennen, dass die Debye-Länge nicht von elektrischen Eigenschaften der Oberfläche abhängt, sondern allein durch die Eigenschaften des Elektrolyts bestimmt ist (Israelachvili,

2011).

Wechselwirkungen zweier elektrochemischer Doppelschichten

Die repulsive Kraft, die in einem elektrolytgefüllten Spalt auf die geladenen Oberflächen wirkt, kann als ein repulsiver Druck p der Gegenionen an einem beliebigen Punkt x beschrieben werden. Aus der Thermodynamik ist die folgende Beziehung bekannt (Israelachvili, 2011; Wagner, 2011)

$$\left(\frac{\partial \mu}{\partial p} \right)_T = v = \frac{1}{\rho} \quad \text{oder} \quad \left(\frac{\partial p}{\partial \rho} \right)_T = \rho \left(\frac{\partial \mu}{\partial \rho} \right)_T \quad \text{Gl.8.19}$$

Mit v dem molarem Volumen, μ dem chemischen Potential, ρ der Dichte, p dem Druck und T der absoluten Temperatur. Zur Erläuterung des osmotischen Druckes gilt Ionenuniformität als Randbedingung. Damit ergibt sich das chemische Potential nach Gl. 8.8. Nähert sich eine Oberfläche

der anderen aus dem unendlichen bis auf eine Distanz D ergibt sich mit dem in Abbildung 8.7 dargestellten Bezugssystem nach Gl.8.19 (Israelachvili, 2011)

$$\left(\frac{\partial p}{\partial x'}\right)_{x,T} = \rho \left(\frac{\partial \mu}{\partial x'}\right)_{x,T} \quad \text{Gl. 8.20}$$

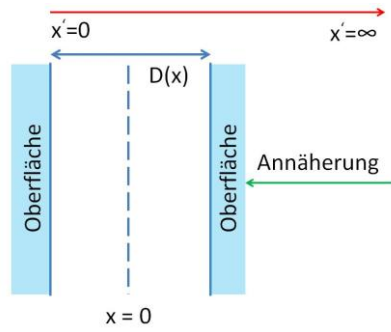


Abbildung 8.7: Bezugssystem zur Errechnung des osmotischen Drucks p (modifiziert nach Israelachvili, 2011).

Wobei x , die beliebige Stelle im Spalt, konstant gehalten wird. Durch Einsetzen von Gl. 8.8 in Gl.8.19 ergibt sich

$$\begin{aligned} \left(\frac{\partial p}{\partial x'}\right)_{x,T} &= \rho \left(\frac{\partial ze\varphi + k_B T \ln \rho}{\partial x'}\right)_{x,T} \\ &= \rho ze \left(\frac{\partial \varphi}{\partial x'}\right)_{x,T} + k_B T \rho \frac{1}{\rho} \left(\frac{\partial \rho}{\partial x'}\right)_{x,T} \end{aligned} \quad \text{Gl. 8.21}$$

Aus Gl. 8.21 ergibt sich für die infinitesimale Änderung des repulsiven Druckes p an der Stelle x im Spalt:

$$dp = \rho ze \left(\frac{\partial \varphi}{\partial x'}\right)_{x,T} dx' + k_B T \rho \frac{1}{\rho} \left(\frac{\partial \rho}{\partial x'}\right)_{x,T} dx' \quad \text{Gl. 8.22}$$

Bei einer Annäherung der Oberfläche relativ zu ihrem Gegenstück aus dem unendlichen ergibt sich ein repulsiver Druck an der Stelle $x' = D$:

$$p_x(D) - p_x(\infty) = p_x(D) = \int_{\infty}^D \left[ze \rho \left(\frac{\partial \varphi}{\partial x'}\right)_{x,T} dx' + k_B T d\rho_x \right] \quad \text{Gl. 8.23}$$

Durch das Einsetzen der Poisson-Boltzmann-Gleichung (Gl. 8.10) und unter der Ausnutzung des Zusammenhangs (Israelachvili, 2011):

$$\frac{d}{dx} \left(\frac{d\varphi}{dx} \right)^2 = 2 \left(\frac{d\varphi}{dx} \right) \left(\frac{d^2\varphi}{dx^2} \right) \quad \text{Gl. 8.24}$$

errechnet sich für den osmotischen Druck an dem Punkt $x'=D$

$$p_x(D) - p_x(\infty) = \left[-\frac{1}{2} \varepsilon_0 \varepsilon \left(\frac{d\varphi}{dx'} \right)^2_{x(D)} + k_B T \rho_{x(D)} \right] - \left[-\frac{1}{2} \varepsilon_0 \varepsilon \left(\frac{d\varphi}{dx'} \right)^2_{x(\infty)} + k_B T \rho_{x(\infty)} \right] \quad \text{Gl. 8.25}$$

Die Indizes $x(D)$ bzw. $x(\infty)$ sagen aus, dass die jeweiligen Werte für die elektrische Feldstärke ($d\varphi/dx$) und die Ionenverteilung ρ an den Stellen $x' = D$ und $x' = \infty$ sind. Gl. 8.25 unterteilt sich in zwei Terme: Der erste ist ein negativer quadratischer Term, der unter den gesetzten Randbedingungen attraktiven Wechselwirkungen ausdrückt (mit Ausnahme der Stellen, an denen die elektrische Feldstärke null ist). Dieser Kraftanteil beschreibt den Beitrag der elektrischen Feldstärke zur Gesamtkraft: Die attraktive Natur dieses Beitrags ist in Abschnitt 5.1.2 qualitativ diskutiert worden. Der zweite Term ist positiv und repulsiv, er stellt den entropischen (osmotischen) Beitrag zur Gesamtkraft dar.

Da, gegeben durch die eingangs gewählten Randbedingungen, im Spalt zwischen den Oberflächen ausschließlich Gegenionen vorhanden sind, ist das Ensemble ionenfrei. Dadurch ergibt sich für $\rho_x(\infty) = 0$, so dass mit dem Zusammenhang

$$\rho_x = \rho_0 \frac{\varepsilon_0 \varepsilon}{2k_B T} \left(\frac{d\varphi}{dx'} \right)^2_x \quad \text{Gl. 8.26}$$

der osmotische Druck p an der Stelle $x' = \infty$ gleich null wird und Gl. 8.25 sich zu

$$p(D) = k_B T [\rho_s(D) - \rho_s(\infty)] \quad \text{Gl. 8.27}$$

vereinfacht. Wobei ρ_s die Gegenionenverteilung an der einen Oberfläche ist, während die andere Oberfläche sich an der Stelle $x' = D$ bzw. $x' = \infty$ befindet.

Diese Gleichung ist als das Kontaktwert-Theorem (engl.: contact value theorem) bekannt (Henderson and Blum, 1978). Diese Gleichung ist gültig, solange keine Kräfte zwischen den Ionen und den Oberflächen vorherrschen, d.h. solange sich keine Ionen an die Oberfläche angelagert, und sie umgeladen haben. Sie sagt aus, dass gegeben durch den osmotischen Druck auf die Oberflächen eine

repulsive Kraft wirkt. Diese Gleichung behält, mit kleinen Verfeinerungen, bei Abstoßungen in Elektrolytlösungen mit Ionen unterschiedlichster Art und Valenz, die durch Überlappungen der elektrochemischen Doppelschicht bedingt sind, ihre Gültigkeit (Israelachvili, 2011).

Versagen der Poisson-Boltzmann-Theorie

In der dargelegten Studie sind sämtliche Messungen in deionisiertem Analysenwasser durchgeführt worden, d.h. das Wasser enthält idealerweise keine Ionen. Dadurch ergibt sich, wie aus Gl. 8.9 ersichtlich, für $\rho \rightarrow 0$ ein Potential $\phi \rightarrow \infty$. Diese Situation ist allerdings unrealistisch da schon durch dissoziiertes Wasser in jeder Lösung Ionen vorliegen, zu denen sich zusätzlich die Gegenionen der die aus der Oberfläche ausgetreten sind. Durch diese Vorgänge besitzt die Poisson-Boltzmann-Gleichung auch in den dargelegten Messungen ihre theoretische Gültigkeit.

Es ist bekannt, dass multivalente Ionen in Lösung eine geringere Tendenz besitzen zu dissoziieren (Riedel, 1994). Dieser Effekt wird auch bei Oberflächen mit einer gewissen Ladungsdichte σ beobachtet. Israelashvili (2011) beschreibt für den Fall einer Kugel auf der die Ladungen durch eine durchschnittliche Länge d getrennt sind, die aus der Coulombkraft resultierende Energie als

$$w \approx zeQ / 4\pi\epsilon_0\epsilon R \approx 4\pi z k_B T R \lambda_B / d^2 \quad \text{Gl. 8.28}$$

wobei z als die Valenz der Ionen, e der Elementarladung, Q die Ladung, R der Radius der Kugel und λ_B die Bjerrum Länge sind. Bei konstantem d ist erkennbar, dass die Wechselwirkung w proportional zu dem Radius der Kugel und der Valenz der Ionen ist. Die Bindungsenergie eines Gegenions zu eine geladenen Oberfläche ist umso größer, je höher die Valenz des Ions ist oder je größer sein Ionenradius. Durch diese Oberflächenvorgänge kann die in Abschnitt 5.1.2 eingeführte Doppelschichtabstoßung reduziert werden. Dieser Effekt ist abhängig von der Geometrie, der Debye-Länge κ^{-1} , der Ionenstärke, der Aktivität a und dem durchschnittlichen Abstand der Ladungen an der Oberfläche d abhängig und wird durch Gl. 8.28 nur unzureichend erklärt. Dieser Effekt ist als Ladungs-, Ionen- oder Manningkondensation bekannt (Manning, 1969; Manning and Ray, 1998)

Neben dem Effekt der Ionenkondensation existiert ein weiterer Effekt, der die gegenseitige Abstoßung gleich geladener Oberflächen abschwächen bzw. umkehren kann. Während die Manningkondensation auf der Abschwächung der repulsiven Wechselwirkungen der elektrochemischen Doppelschicht beruht, ergeben sich sogenannte Ionenkorrelationskräfte (in der Literatur auch Ladungsfluktuationskräfte beschrieben) durch mobile Gegenionen in der elektrochemischen Doppelschicht (Oosawa, 1970). Diese zusätzlichen attraktiven elektrostatischen Kräfte stehen im Gegensatz zur Poisson-Boltzmann-Gleichung, die bei jeder Distanz zwischen den Oberflächen repulsive Kräfte voraussagt. Die mobilen Ionen der elektrochemischen Doppelschicht stellen eine hoch

polarisierbare Schicht dar, durch deren Dichtefluktuations an den jeweiligen Oberflächen eine gegenseitige attraktive Kraft entstehen kann.

DLVO-Theorie

Wie eingangs erwähnt entsteht die Gesamtkraft, die in einem Spalt zwischen zwei ähnlich geladenen Oberflächen herrscht, aus dem Zusammenspiel verschiedener Kräfte. Neben den ausgiebig diskutierten Wechselwirkungen zwischen den elektrochemischen Doppelschichten, die in der Poisson-Boltzmann-Gleichung Beachtung finden, tragen die allgegenwärtigen van der Waals-Kräfte zur resultierenden Kraft bei. Van der Waals-Kräfte sind gegenüber Umgebungsvariationen wie der Ionenstärke oder dem pH-Wert weitgehend unempfindlich und können in guter erster Näherung als konstant angenommen werden. Da van der Waals Kräfte einem exponentiellen Zusammenhang folgen (z.B. $W \equiv -1/D^n$), sind sie verglichen mit den Doppelschichtwechselwirkungen Kräfte kurzer Reichweite. Van der Waals-Kräfte hängen allerdings sehr stark von der Geometrie der Körper zwischen denen diese Kraft herrscht ab. Bei der Betrachtung von Oberflächen einer gewissen Ladungsdichte in Elektrolytlösungen unterschiedlicher Ionenstärke beobachtet man in Abhängigkeit von der Ionenstärke und der Oberflächenladungsdichte unterschiedliche, als Funktion der Distanz auftretende Energieprofile. So zeigen Oberflächen hoher Ladungsdichte in deionisiertem Wasser eine hohe Repulsion. In Lösungen höherer Ionenstärke durchläuft die Wechselwirkungskurve ein lokales Minimum, bevor eine Energiebarriere erscheint, nach deren Überwindung starke attraktive Kräfte vorherrschen. Mit einer Kombination der erwähnten Kräfte liefern Derjaguin und Landau (1941) und Verwey und Overbeek (1947) in einem theoretischen Modell, der DLVO-Theorie, eine Erklärung für dieses Verhalten von sich annähernden Oberflächen (Verwey, 1947; Christenson, 1984; Derjaguin and Landau, 1993)

8.1.3 Mechanik

Mechanische Verformungen, wie sie während rheologische Experimente an Zellen auftreten, werden

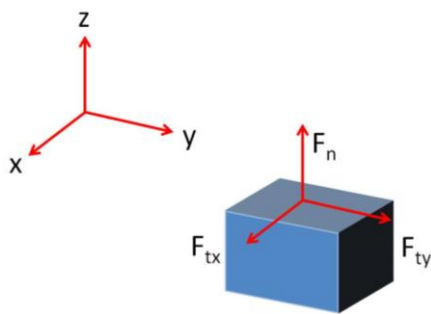
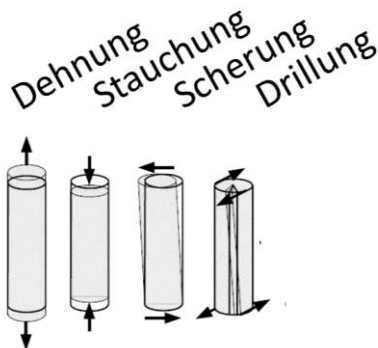


Abbildung 8.8: Angriff von Kräften auf eine Fläche (rot)

trotz ihrer geringen Skalengröße (10^{-6}) nach den Gesetzen der klassischen Mechanik deformierbarer Körper beschrieben. Zerlegt man eine die Fläche A angreifende Kraft in ihre zur Fläche senkrecht angreifende Komponente (Normalkraft) F_n und in die parallel zur Fläche angreifenden Komponenten (Tangentialkräfte) F_{tx} und F_{ty} , so können je nach Wirkrichtung der angreifenden Kräfte unterschiedliche Deformationen am Körper (Zelle) auftreten.

- a) Dehnung (F_n wirkt von der Fläche A weg = Zug)
- b) Stauchung (F_n wirkt auf die Fläche A = Druck)
- c) Scherung (bewirkt durch Tangential- oder Scherkräfte)
- d) Torsion (bewirkt durch Tangential- oder Scherkräfte)



Im einfachsten Fall werden die Grundtypen der Deformation (Abbildung 8.9) in der Mechanik deformierbarer Körper von Gleichungen beschrieben, die einen linearen Zusammenhang aufweisen. Für die Spannung σ , die während einer Stauchung (Abbildung 8.9, a) oder einer Dehnung (Abbildung 8.9, b) auftritt, wird dieser lineare Zusammenhang durch das Hookesche – Gesetz beschrieben.

Abbildung 8.9: Typen der Deformationen

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad \text{Gl. 8.29}$$

Wobei die Spannung σ die Einheit $[N/m^2]$ besitzt. Da die Dehnung ε das Verhältnis der Längenänderung Δl [m] zur Gesamtlänge l [m], d.h. $\Delta l/l_0$, und damit dimensionslos ist, hat der Elastizitätsmodul E die Einheit $[N/m^2]$. Im Spannungs-Dehnungs-Diagramm (Abbildung 8.10) gehört der lineare und

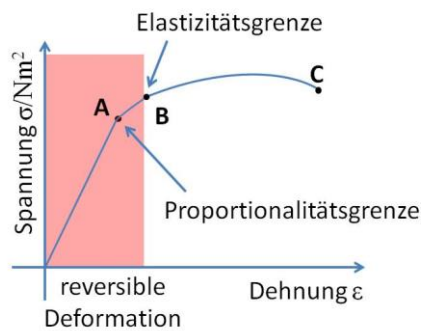


Abbildung 8.10: Spannung-Dehnungs-Diagramm

Zusammenhang (Abbildung 8.10, bis A) zum Bereich der reversiblen Deformation des Körper. Darauf folgt ein nichtlinearer, elastischer Bereich, in welchem die Verformung noch reversibel aber nicht mehr der Spannung proportional ist (Abbildung 8.10, bis zu B der Elastizitätsgrenze). Wenn diese Elastizitätsgrenze überschritten wird, beginnt der plastische Bereich, in dem die Verformung plastisch, d.h. irreversibel ist. Die Deformationen entstehen durch Versetzungsbewegungen in der Molekularstruktur des Bauteils und sind temperatur- und dehnratenabhängig (Abbildung 8.10 bis Punkt C, thermisch aktiviertes Fließen). Eine Dehnung über Punkt C hinaus führt zu Materialversagen.

Betrachtet man die durch Tangentialkräfte F_t bzw. Scherkräfte hervorgerufene Scherung oder Drillung (Abbildung 8.9, c und d), wird dieser Zusammenhang durch die Gleichung:

$$\tau = G\gamma \quad \text{Gl. 8.30}$$

beschrieben. In Gl. 8.30 hat τ , vergleichbar mit σ , die Dimension eines Druckes [Pa], bzw. [N/m²]. Der bei einer Scherung sich proportional zum Schubmodul G ändernde Winkel γ (Abbildung 8.11) ist dimensionslos. Das Schubmodul G besitzt somit wieder die Dimension [N/m²]. Wenn auf die Oberfläche eines rechteckigen Körpers mit dem Volumen V_0 allseitig Spannungen wirken, d.h. auf jeder Seite des Quaders eine Normalkraft F_n wirkt, ist eine Volumenänderung ΔV durch die einwirkende Druckerhöhung dp gegeben. Im Falle einer isotropen Druckverteilung ist $\Delta V/V_0$ proportional zu dp . Bezieht man in die Gleichung die beiden

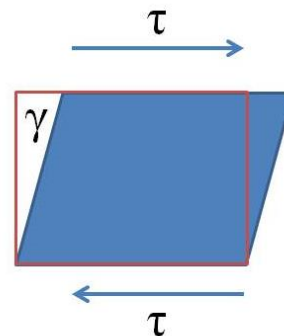


Abbildung 8.11: Wirkung von Tangentialkräften

Proportionalitätskonstanten, das Kompressionsmodul K und die Kompressibilität κ mit ein, ergibt sich der Zusammenhang:

$$dp = -K \frac{\Delta V}{V_o} = -\frac{1}{\kappa} \frac{\Delta V}{V_o} \quad \text{Gl. 8.31}$$

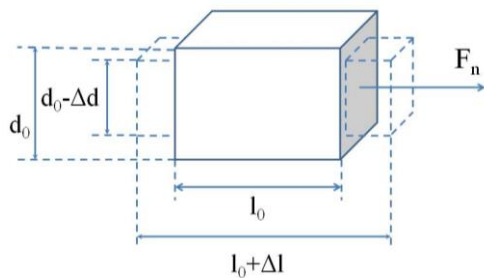
Die Kompressibilität:

$$\kappa = -\frac{1}{V} \frac{dp}{dV} \quad \text{Gl. 8.32}$$

hat die Dimension eines reziproken Druckes $[1/Pa]$ und ist ein Maß dafür, wie leicht ein Körper komprimierbar ist. Da die Dimension der Kompressibilität reziprok ist, hat das Kompressionsmodul, wie der Elastizitätsmodul oder der Schubmodul, die Einheit des Druckes $[Pa]$ (Meschede, 2004; Marti, 2006; Ikai, 2008).

8.1.4 Bedeutung der Poisson-Zahl

Bei den bisher beschriebenen Deformationen unter Normalspannung wurde nur eine Verformung in Richtung der Kraft betrachtet. In den meisten Fällen kommt es unter Einwirkung einer Normalspannung σ nicht nur zur Formänderung in Richtung der Kraft, sondern auch senkrecht dazu. Diese Längenänderung in Richtung und Senkrecht zur Normalspannung können zu einer Änderung der Gestalt des Körpers führen (Meschede, 2004; Marti, 2006; Ikai, 2008).



Der Zusammenhang zwischen der relativen Längenänderung $\varepsilon = \Delta l / l_0$ in Richtung der Kraft und der relativen Änderung senkrecht zur wirkenden Kraft $\varepsilon_{\text{quer}} = \Delta d / d_0$ ist durch die Querkontraktionszahl μ gegeben:

Abbildung 8.12: Deformation eines Körpers unter Normalspannung

$$\mu = -\frac{\Delta d}{d_0} \cdot \frac{l_0}{\Delta l} = -\frac{\varepsilon_{\text{quer}}}{\varepsilon} \quad \text{Gl. 8.33}$$

Die Querkontraktionszahl wird auch Poisson-Zahl genannt und ist ein Maß für die durch die Körperverformung entstehende Volumenänderung ΔV . Mit $\Delta l / l_0$ und $\Delta d / d_0 = -\nu \varepsilon$ (siehe Gl. 8.33) ergibt sich laut Marti, 2006; Ikai, 2008 für die relative Volumenänderung ϑ

$$\vartheta = \frac{\Delta V}{V_0} = \varepsilon - 2\mu\varepsilon = \varepsilon(1 - 2\mu) \quad \text{Gl. 8.34}$$

Gl. 8.34 sagt aus, dass eine Poissonzahl von 0.5 mit $\Delta V = 0$ einhergeht. Ein Material mit $\mu = 0.5$ ist damit inkompressibel. Eine Volumenabnahme findet bei Materialien mit Poisson-Zahlen < 0.5 statt. Die Poisson-Zahl muss die Ungleichung

$$0 \leq \mu \leq 0.5 \quad \text{Gl. 8.35}$$

erfüllen (Marti, 2006). Bei Poisson-Zahlen < 0 würde unter Zugbelastung eine Volumenzunahme stattfinden, was allerdings nur theoretisch möglich erscheint (Ikai, 2008).

Die Poissonzahl μ verbindet das Elastizitätsmodul (E), das Schubmodul (G) und das Kompressionsmodul (K) über

$$E = 2G(1 + \nu) = 3(1 - 2\nu)K = \frac{3(1 - 2\nu)}{\kappa} \quad \text{Gl. 8.36}$$

Das bedeutet, dass Materialien mit kleiner Kompressibilität κ , also Körper, die bei einer hohen Druckänderung nur eine kleine Volumenänderung erfahren, fest sind. Ihr Schubmodul G und ihr Elastizitätsmodul E ist groß und sie sind damit sehr schwer zu verformen (Timoshenko and Gere, 2002; Ikai, 2008). Dabei gibt die Poissonzahl an, ob sich bei einer elastischen Verformung eines Körpers eine Volumenänderung ereignet.

8.1.5 Viskoelastische Eigenschaft von Zellen

Einige Körper zeigen eine ausgeprägte, zeitliche Abhängigkeit von der Belastungsgeschwindigkeit mit einer entsprechenden Kraft F ($\dot{\varepsilon} = d\varepsilon/dt$). Mit anderen Worten zeigen diese Materialien bei konstanter Spannung eine zeitliche veränderliche Dehnung. Dieses Materialverhalten heißt Kriechen. Diese Materialien nennt man viskoelastisch, unter ihnen befinden sich Metalle erhöhter Temperatur, Beton und Kunststoffe (Flügge, 1967).

Zellen besitzen viskoelastische Eigenschaften, d.h. sie besitzen neben ihrer Elastizität ausgeprägte Flüssigkeitseigenschaften (Marszalek et al., 1989; Poznanski et al., 1992; Karcher et al., 2003). Dabei ist der jeweilige Ausprägungsgrad der entsprechenden mechanischen Eigenschaft von der Dauer der Krafteinwirkung bestimmt. Obwohl die Ursachen auf molekularer Ebene für die Viskoelastizität stark materialabhängig sind, lässt sich Viskoelastizität mit einem einfachen mechanischen Ersatzmodell beschreiben. Hierzu wird eine Masse für die Trägheit, eine Feder für die elastischen Eigenschaften und ein Dämpfungselement zur Charakterisierung der Flüssigkeitseigenschaften verwendet. In der Regel werden zwei Modelle unterschieden: das Maxwell

Modell und das Voigt Modell. Diese Modelle sind beliebig kombinierbar und können ebenfalls durch die Elemente Dämpfer und Feder ergänzt werden.

8.1.6 Voigtmodell zur Beschreibung viskoelastischer Körper

Das Verhalten viskoelastischer Materialien unter einer uniaxialen Spannung σ , die zu einer Dehnung ε führt, wird durch Modelle beschrieben, die durch eine Kombination von Komponenten mit eindeutig elastischem Charakter (Feder, Abbildung 8.13, a) sowie eindeutig viskosem Charakter (Dämpfer, Abbildung 8.13, b) gekennzeichnet sind (Flügge, 1967; Shirato et al., 1986; Ikai, 2008). Dabei wird, bei linearem, elastischem Verhalten der Feder, die Dehnung ε durch das Hookesche Gesetz mit seiner bekannten Proportionalitätskonstanten E , dem Elastizitätsmodul, formuliert (Gl. 8.29). Die zweite Komponente, der Dämpfer, zeigt keine Proportionalität der Dehnung ε zur Spannung σ , d.h. zur flächennormierten Kraft ($p = [Pa = N/m^2]$). In diesem Fall ist die Elongation des Materials $\Delta l = l\varepsilon$ nicht proportional zu der Kraft F sondern die zeitabhängige Elongationsrate $d(\varepsilon l)/dt$, d.h. die Geschwindigkeit der Eindringtiefe des Zylinders in den Kolben. Mit einfachen Worten ausgedrückt: Je stärker die auf den Kolben wirksame Kraft F , desto weniger Zeit wird benötigt, damit sich der Kolben in den Zylinder bewegt. Bei einem linearen Zusammenhang liegt die Relation $F = k(dl/dt)$ vor. Bezogen auf die mechanischen Größen Spannung σ und Dehnung ε ergibt sich der Zusammenhang:

$$\sigma = \eta \frac{d\varepsilon}{dt} = \eta \dot{\varepsilon} \quad \text{Gl. 8.37}$$

Mit η als Proportionalitätskonstante für den viskos reagierenden Dämpfer. An Hand des Maxwell-Modells (Abbildung 8.13 c) soll die Gültigkeit solcher rheologischer Modelle als theoretische Formulierung eines Materialgesetzes und die auf diese Weise abgebildete Realität exemplarisch demonstriert werden. Das Maxwell'sche Kompositmodell besteht aus einer Feder auf die, in Reihe geschaltet, ein Dämpfer folgt.

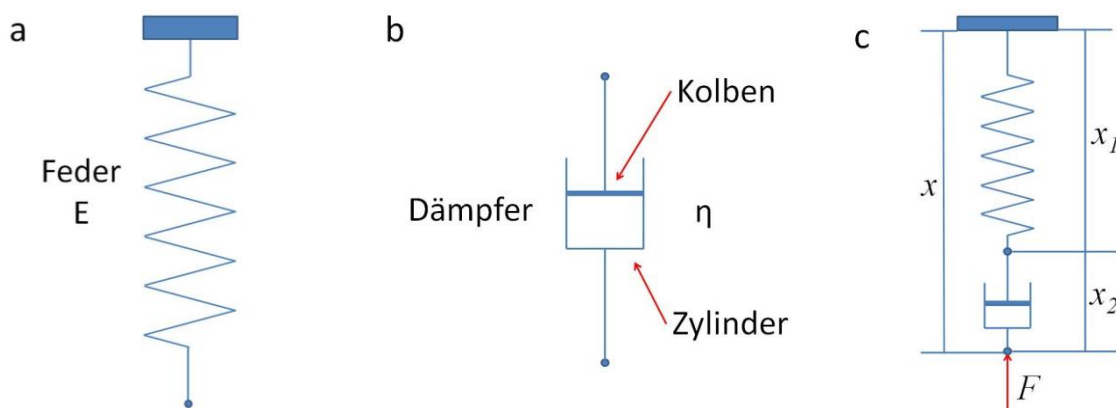


Abbildung 8.13: Komponenten der Ersatzmodelle. a) Feder, elastischer Anteil, E = Elastizitätsmodul b) Dämpfer, viskoser Anteil, η = viskose Proportionalitätskonstante c) Maxwell-Ersatzmodell

Durch eine auf diese Glieder wirksame Kraft F entsteht, wie in Abbildung 8.13 c mittels des roten Pfeils dargestellt, eine Dehnung bzw. eine Stauchung ϵ , die sich in einer Änderung Δx_2 der Strecke Δx , zusammengesetzt aus den Längen Δx_1 und Δx_2 der einzelnen Komponenten, zeigt. Da für die Längenänderung eines elastischen Körpers bei Anwendung des Maxwellmodells gelten, folgt für die erwähnte Längenänderung Δx aus

$$\Delta x = \Delta x_1 + \Delta x_2 \quad \text{Gl. 8.38}$$

Die auf die Feder und auf den Dämpfer wirksamen Kräfte F_1 und F_2 entsprechen der Gesamtkraft F , die auf den Körper einwirkt, so dass gilt

$$F = F_1 = F_2, \quad \text{Gl. 8.39}$$

F_1 ergibt sich aus dem Hookesche Gesetz (Gl. 8.29 als flächennormierte Form)

$$F_1 = c \cdot \Delta x_1 \quad \text{Gl. 8.40}$$

mit c als Proportionalitätskonstante mit der Dimension $[N/m]$ und Δx_1 als Federweg in $[m]$. Für die auf den Dämpfer wirksame Kraft F_2 gilt

$$F_2 = d \cdot \Delta \dot{x}, \quad \text{Gl. 8.41}$$

Aus Gl. 8.38 ergibt sich

$$\Delta \dot{x} = \Delta \dot{x}_1 + \Delta \dot{x}_2 \quad \text{Gl. 8.42}$$

Durch Gl. 8.42 kann eine Beziehung zwischen der Kraft F und der Elongation x in dem Feder – Dämpfermodell gefunden werden.

$$\Delta \dot{x} = \frac{\dot{F}_1}{c} + \frac{F_2}{d} \quad \text{Gl. 8.43}$$

oder als flächennormierte Darstellung bezogen auf Spannung σ und Dehnung ϵ

$$\frac{\dot{\sigma}_1}{E} + \frac{\sigma_2}{\eta} = \dot{\epsilon}_1 + \dot{\epsilon}_2 = \dot{\epsilon} \quad \text{Gl. 8.44}$$

mit der Dämpfungskonstante D und in der Standardform (Flügge, 1967)

$$\sigma + p_1 \dot{\sigma} = q_1 \dot{\varepsilon} \quad \text{Gl. 8.45}$$

Zur Verdeutlichung der Bedeutung dieser Differentialgleichung und ihrer theoretischen Darstellung viskoelastischer Körper unter Last, z.B. die Kraftwirkung einer Sonde konstanter Höhe während eines SCFS-Experiments, wird Gl. 8.45 unter der Berücksichtigung zweier Grenzfälle diskutiert. Wirkt auf den Körper ab dem Zeitpunkt $t = 0$ eine konstante Spannung $\sigma = \sigma_0$, d.h. für den Term $p_1 \dot{\sigma} = 0$ auf dem Intervall $[0, t_1]$, ergibt sich für die Dehnung $\varepsilon(t)$ zu diesem Zeitpunkt eine Lösung der Differentialgleichung Gl. 8.45 für ε als

$$\varepsilon = \frac{\sigma_0}{q_1} t + C_1 \quad \text{Gl. 8.46}$$

Mit einer Integrationskonstante C_1 für dessen Lösung eine Anfangsbedingung benötigt wird. Um die Größenordnung der Spannung σ_0 zu erhalten, wird Gl. 8.45 um den Zeitpunkt $t = 0$ für $\dot{\sigma}(t)$ auf einem Intervall $[-\tau, \tau]$ integriert.

$$\int_{-\tau}^{\tau} \sigma dt + p_1 [\sigma(\tau) - \sigma(-\tau)] = q_1 [\varepsilon(t) - \varepsilon(-\tau)] \quad \text{Gl. 8.47}$$

Für $\tau \rightarrow 0$ ergibt sich für den Term $\sigma dt = 0$ und für das gesamte Integral

$$p_1 \sigma_0 = q_1 \varepsilon_0 \quad \text{und damit} \quad \varepsilon_0 = \frac{p_1 \sigma_0}{q_1} = \frac{\sigma_0}{E_0} = C_1 \quad \text{Gl. 8.48}$$

Es folgt aus Gl. 8.46 und Gl. 8.48

$$\varepsilon = \frac{\sigma_0}{q_1} (p_1 + t) \quad \text{Gl. 8.49}$$

Anschaulich bedeuten die oben angeführten Gleichungen (Gl. 8.38 - Gl. 8.49), dass bei einer bestimmten Auslenkung bzw. Stauchung eines viskoelastischen Körpers der Maxwell'schen Art bis zu einem bestimmten Punkt x zu einem bestimmten Zeitpunkt t_1 mit einer konstanten Kraft F und einer konstanten Dehnungsrate $d\varepsilon/dt$ nach Gl. 8.41 der Körper einer konstanten Spannung nach Lösung der DGL Gl. 8.49 ausgesetzt ist. In Abbildung 8.14 a bzw. b ist dieses Materialverhalten in a durch das Plateau auf dem Intervall $[0, t_1]$ und in b an der konstanten Steigung $d\varepsilon/dt$, der Zugrate, auf demselben Intervall zu sehen. Die Kraft F wirkt auf die Feder und den Dämpfer gleichermaßen (Gl. 8.39) und führt somit zu einer Dehnung des Körpers, die durch beide Komponenten beeinflusst ist.

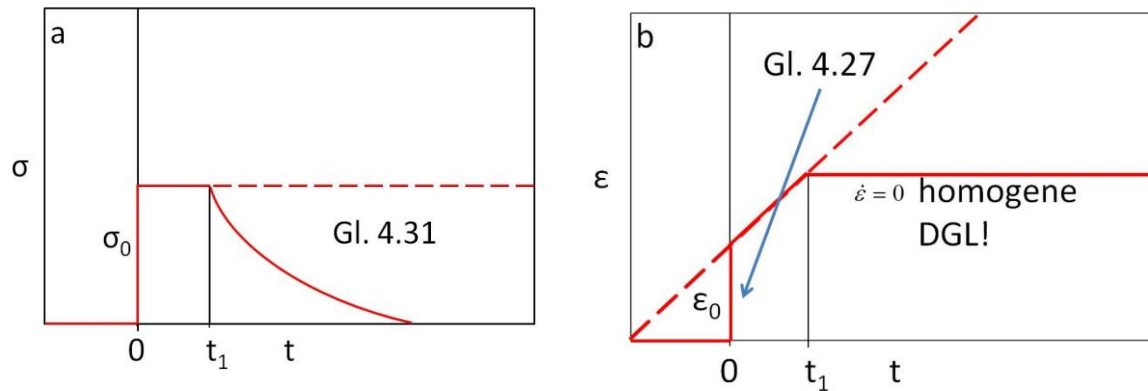


Abbildung 8.14: Zeitliche Entwicklung der Spannung σ (a) und der Dehnung ϵ (b) im Falle des Maxwell-Modells

Der zweite Grenzfall behandelt das Verhalten eines viskoelastischen Körpers Maxwellscher Art bei einer konstanten Dehnung, d.h. genau der maximalen Auslenkung x am Zeitpunkt t_1 (vergl. Abbildung 8.14). Da eine maximale Dehnung ϵ_1 vorliegt, die keiner zeitlichen Veränderung unterliegt, ist die Rate $d\epsilon/dt = 0$. Es liegt unter diesen Umständen in Gl. 8.44 eine homogene Differentialgleichung mit der Lösung

$$\sigma = C_2 e^{-(t/p_1)} \quad \text{Gl. 8.50}$$

vor. Mit einer Integrationskonstante C_2 , die mit $t = t_1$ den Wert σ_0 annimmt. Somit ergibt sich aus Gl. 8.50

$$\sigma = \sigma_0 e^{-(t-t_1/p_1)} \quad \text{Gl. 8.51}$$

Anschaulich bedeutet dies, dass nach dem Erreichen der maximalen Auslenkung keine weitere Dehnung mehr stattfindet, d.h. $\dot{\epsilon} = 0$. Da an diesem Punkt durch die vorherige Krafteinwirkung eine Federspannung vorliegt, übt diese Spannung eine Kraft auf den Dämpfer aus, die dieser aufnimmt und so zu der Abklingkurve führt. Man kann sagen, dass im ersten Schritt die Dehnung ϵ unter konstanter Spannung σ zunimmt. Dieses Materialverhalten nennt man Kriechen, den dazugehörigen Abschnitt

Kriechphase. Der zweite Schritt führt unter konstanter Dehnung zu einer Relaxation des Materials, entsprechend nennt man diese Phase Relaxationsphase.

In Abbildung 8.14 zeigen die gestrichelten Linien das Materialverhalten bei einer Dehnung des Körpers über den Punkt x zum Zeitpunkt t_1 hinaus, d.h. das wirken einer Konstanten Kraft F für $t \rightarrow \infty$.

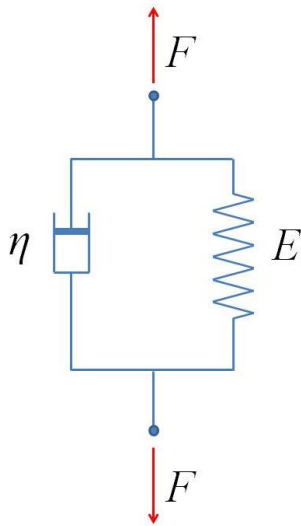


Abbildung 8.15: Ersatzmodell
Kelvin Voigt-Körper

In gewissen Grenzen sind diese Materialeigenschaften, bis zum Materialversagen, bei einigen Materialien, z.B. Gummi, zu beobachten. Allerdings ist dieses strikt lineare Verhalten eines viskoelastischen Körpers auf eine Krafteinwirkung physikalisch unrealistisch und zur Beschreibung solchen Verhaltens werden realistischere Modelle benötigt. In dem Bereich dieser Linearität zeigen solche Materialien allerdings die typischen Eigenschaften einer Flüssigkeit: die Fähigkeit einer unbeschränkten Ausdehnung/Deformation unter der Einwirkung einer endlichen Kraft. Ein Material, das durch die Differentialgleichung Gl. 8.45 und Abbildung 8.14 beschrieben wird, wird aus diesem Grund auch Maxwell – Fluid genannt.

Ein anderes einfaches Modell zur Beschreibung von Materialien bzw. Körpern mit viskoelastischen Eigenschaften ist das Kelvin – Voigt – Modell (Abbildung 8.15) Im Gegensatz zu dem Modell für ein Maxwell Fluid (Abbildung 8.13 c), bei dem sich die Gesamtdehnungen Δx (vergl. Gl. 8.41) aus den jeweiligen Dehnungen der Feder ($\Delta x'$) und des Dämpfers ($\Delta x''$) ergibt (vergl. Gl. 8.38), spaltet sich hingegen bei dem Kelvin – Voigt – Modell die wirksame Kraft F bei einer gesamten Dehnung $\Delta x = \Delta x' = \Delta x''$ als F' (Feder) und F'' (Dämpfer) anteilig auf. Nach den schon im Maxwell – Modell Beachtung gefundenen Gesetzmäßigkeiten Gl. 8.40 und Gl. 8.41 gilt wiederum bezogen auf die flächennormierten Größen σ und ε

$$\sigma' = E\varepsilon \quad \text{Gl. 8.52}$$

bzw.

$$\sigma'' = \eta \dot{\varepsilon} \quad \text{Gl. 8.53}$$

woraus wiederum folgt

$$\sigma = \sigma' + \sigma'' = E\varepsilon + \eta\dot{\varepsilon} \quad \text{Gl. 8.54}$$

und in der Standardform (Flügge, 1967)

$$\sigma = q_0\varepsilon + q_1\dot{\varepsilon}. \quad \text{Gl. 8.55}$$

Bei der Betrachtung der schon für das Maxwell – Modell verwendeten Grenzfälle ergibt sich für $\sigma = \sigma_0$ als Lösung der inhomogenen Differentialgleichung Gl. 8.55

$$\varepsilon = \frac{\sigma_0}{q_0} + C_1 e^{-\lambda t}, \quad \lambda = \frac{q_0}{q_1}. \quad \text{Gl. 8.56}$$

Springt an einem Zeitpunkt $t = 0$ die Spannung σ von einem Wert 0 zu σ_0 , geschieht das um einen endlichen Betrag. Um der Differentialgleichung Gl. 8.55 zu genügen, muss der zweite Term aus Gl. 8.55, die zeitliche Ableitung der Dehnung ε , für $t = 0$ ebenfalls endlich sein. Da diese Ableitung nicht gegen unendlich geht, liegt auch für die zeitabhängige Funktion $\varepsilon(t)$ kein Sprung vor. Als Anfangswert gilt deshalb $\varepsilon(0) = 0$ und für C_1 folgt daraus $C_1 = -\sigma_0/q_0$.

$$\varepsilon = \frac{\sigma_0}{q_0} (1 - e^{-\lambda t}) \quad \text{Gl. 8.57}$$

Abbildung 8.16 illustriert dieses Materialverhalten. Die gestrichelte Linie stellt wieder das Kriechverhalten bei einer konstanten Kraft bzw. Spannung für $t \rightarrow \infty$ dar. Gegensätzlich zum Maxwell – Modell führt hier das Wirken einer konstanten Kraft über einen unendlichen Zeitraum nicht zu einer, physikalisch unsinnigen, unendlichen Dehnung, sondern erreicht asymptotisch einen Grenzwert (Abbildung 8.16 b), der proportional zur angelegten Spannung ist. Dieses Materialverhalten gleicht dem eines elastischen Festkörpers, bis auf die Tatsache, dass durch die Spannungsapplikation nicht direkt die maximale Spannung im Material auftritt, sondern sich, ähnlich der Dehnung, an den Maximalwert asymptotisch annähert. Da solch ein Materialverhalten dargestellt in Abbildung 8.16 und Gl. 8.55 das Verhalten eines Festkörpers ist, werden solche Materialien Voigt – Festkörper oder Kelvin – Festkörper genannt. Im Verlauf dieses Kapitels wird daher der Begriff Kelvin – Voigt – Modell verwendet (Flügge, 1967).

Durch die Teilung der Kraft auf die Feder bzw. den Dämpfer (vergl. Gl. 8.54) verliert das Modell ein wenig an Anschaulichkeit. Eine Zuordnung der zeitabhängigen Eigenschaften der Komponenten ist verglichen mit dem Maxwell-Modell schwierig. Ist im Maxwell – Modell im Intervall $< t_1$ bei einer konstanten Spannung σ_0 die zeitabhängige Funktion $\varepsilon(t)$ gemäß Gl. 8.41 eine Gerade die das Verhalten des Dämpfers widerspiegelt (konstante Kraft = konstante Dehnungsrate, d.h. konstante Steigung), ist

im Intervall $t > t_1$ bei Konstanthalten einer erreichten Dehnung am Punkt x eine typische Abklingkurve der Spannung σ zu beobachten, die aus der dissipativen, in den Dämpfer überführten Federspannung entsteht. Eine derartige klare Zuordnung der Auswirkungen der jeweiligen Komponenteneigenschaften ist im Kelvin-Voigt-Modell schwieriger.

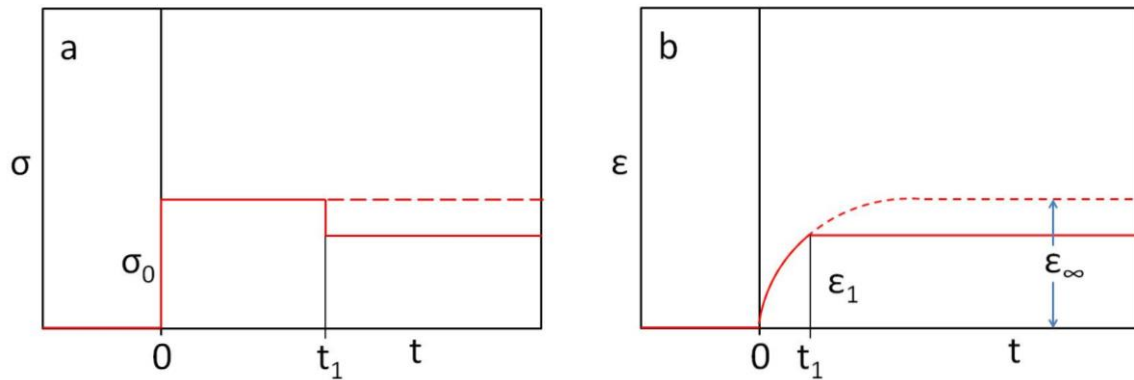


Abbildung 8.16: Zeitliche Entwicklung von Spannung σ (a) und Dehnung ϵ (b) im Falle des Kelvin-Voigt-Modells

Während der Relaxationsphase für $t > t_1$ unterliegt der Körper keiner weiteren Dehnung ($\epsilon = \text{konst} = \epsilon_1$). Da unter solchen Umständen für $\dot{\epsilon} = 0$ gilt, ergibt sich aus Gl. 8.55 und Gl. 8.57

$$\sigma = q_0 \epsilon_1 = \sigma_0 (1 - e^{-\lambda t_1}) \quad \text{Gl. 8.58}$$

was zu einer konstanten Spannung σ führt, die wegen Gl. 8.58 kleiner als σ_0 sein muss (vergl. Abbildung 8.16 a).

8.1.7 Hertzmodell zur Beschreibung elastischer Körper

1882 entwickelte Heinrich Hertz ein Modell für das Verhalten elastischer Körper unter Krafteinwirkung

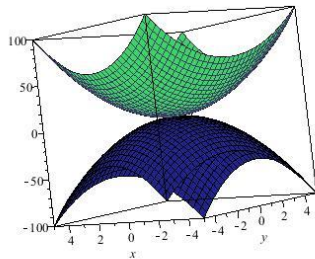


Abbildung 8.17: Pressung zweier Körper. Darstellung der Geometrien aus Gl 4.40 und 4.41

senkrecht zu ihrem Kontaktpunkt (Hertz, 1888; Johnson, 1985; Fischer-Cripps, 2000; Herak et al., 2006; Muthukumar and DesRoches, 2006). Werden zwei Körper unterschiedlicher Art in Kontakt gebracht, findet eine punktuelle, initiale Berührung statt. Unter einer anfänglich geringen Kraft F findet eine Deformation beider Körper in der Nachbarschaft dieses Punktes statt und bildet eine Fläche, die je nach Materialeigenschaften, unterschiedlich klein gegenüber den Ausmaßen der jeweiligen Körper ist. Die Ausdehnung dieser Fläche wird anhand des Hertz-Modells bestimmt (Johnson, 1985). Handelt es sich bei den sich nähernden Körpern um solche, die durch eine stetige Funktion

der Form (vergl. Abbildung 8.23)

$$z = Ax^2 + By^2 + Cxy \quad \text{Gl. 8.59}$$

um den Punkt des initialen Kontakts der Körper unter einer einwirkenden Kraft F beschrieben werden können, können durch geschickte Wahl der x - und y -Achse, x_1 und y_1 , der xy -Term in Gl. 8.59 vernachlässigt werden und der Ort des Kontaktes auf der Oberfläche kann näherungsweise durch die untere Hälfte eines Rotationsellipsoids beschrieben werden. In Abbildung 8.18 ist dieser Sachverhalt in einem zweidimensionalen Koordinatensystem anhand einer Parabel ($A \cdot x^2$) und eines Kreises dargestellt.

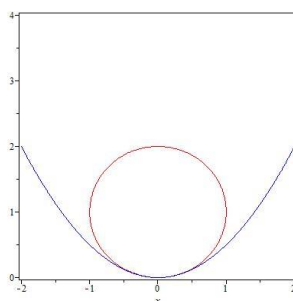


Abbildung 8.18: Darstellung eines Kreises anhand einer Parabel

Der Radius des Kreises in Abbildung 8.18 beträgt $R = 1$ (Einheit auf der x -Achse). Der Faktor A dieser Parabel beträgt $A = 0.5 \cdot R = 0.5$. Gl. 8.59 kann also

$$z_1 = \frac{1}{2R_1} x_1^2 + \frac{1}{2R_1} y_1^2 \quad \text{Gl. 8.60}$$

geschrieben werden. Wobei R_1' und R_1'' die Radien der jeweiligen Hauptkrümmung der gewählten Geometrie relativ zur x- bzw. y – Achse sind (vergl. Abbildung 8.17). Der Index deutet an, dass es sich um den ersten der beiden sich berührenden Körper handelt. Die korrespondierende Oberfläche dazu, da quasi auf den Kopf gestellt, wird als

$$z_2 = -\frac{1}{2R_2'}x_2^2 + \frac{1}{2R_2''}y_2^2 \quad \text{Gl. 8.61}$$

dargestellt (Abbildung 8.17). Wobei R_2' und R_2'' wieder die Radien der Geometriekrümmung darstellen, die von denen der ersten verschieden sein können. Bei der Richtungswahl der x- und y-Achsen der jeweiligen Körper wird darauf geachtet, dass sie entlang der jeweiligen Hauptkrümmung des Körpers liegen, um eine möglichst einfache mathematische Darstellung des vorliegenden Körpers zu haben (vergl. Abbildung 8.19). Werden diese Körper in Kontakt gebracht, geschieht dies unter einem willkürlich gewählten Winkel θ ihrer axialen Ausrichtung und damit auch ihrer Achsensysteme, z.B. y_1 und y_2 (Abbildung 8.20).

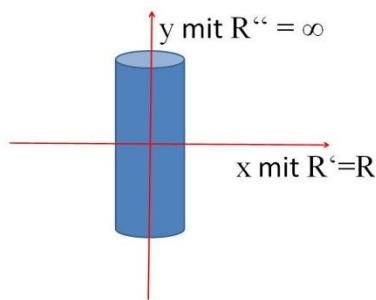


Abbildung 8.19: Achsenwahl geometrischer Körper zur Bestimmung ihrer Kontaktfläche.

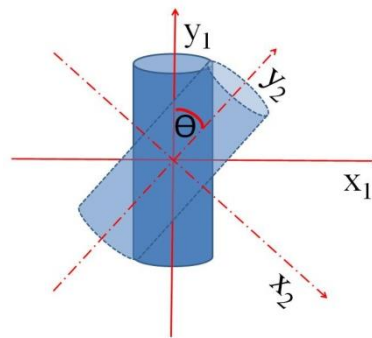


Abbildung 8.20: Abhängigkeit der Kontaktfläche von der Orientierung der Körper zueinander

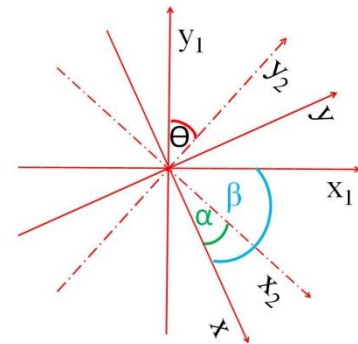


Abbildung 8.21: Transformation in ein gemeinsames Koordinatenkreuz

Bei einer Transformation der Körper in ein gemeinsames Koordinatensystem (x, y) mit den Winkeln α zwischen x_1 und x und β zwischen x_2 und x (Abbildung 8.21), ergibt sich der Abstand zweier Körper an einem bestimmten Punkt (x, y) an seiner Oberfläche, beispielsweise in der in Abbildung 8.17 gegebenen Geometrie, durch die Funktion h

$$h = z_1 - z_2 = Ax^2 + By^2 + Cxy \quad \text{Gl. 8.62}$$

Diese Funktion dient zur weiteren Beschreibung der Kontaktflächenvergrößerung und der inneren Druckverteilung elastisch deformierbarer Körper unter einer Kraft F . Unter bestimmten Bedingungen (siehe Johnson, 1985, Appendix 2) ist die Bedingung für $Cxy = 0$ erfüllt und Gl. 8.62 lässt sich als

$$h = Ax^2 + By^2 = \frac{1}{2R_1'}x^2 + \frac{1}{2R_1''}y^2 \quad \text{Gl. 8.63}$$

schreiben, wobei A und B jeweils positive Konstanten und R' und R'' die Radien der Hauptkrümmungen in x und y Richtung der Abstandsfunktion h sind. Sind unter diesen Bedingungen die Achsen der Hauptkrümmung, z.B. x_1 und x_2 , unter einem bestimmten Winkel (im Fall des Beispiels α) zueinander geneigt, dann gilt in Einklang mit Anhang 2 (Johnson, 1985)

$$(A+B) = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{R'} + \frac{1}{R''} \right) = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{R'_1} + \frac{1}{R'_1} + \frac{1}{R'_2} + \frac{1}{R'_2} \right) \quad \text{Gl. 8.64}$$

und

$$|B-A| = \frac{1}{2} \left\{ \left(\frac{1}{R'_1} - \frac{1}{R'_1} \right)^2 + \left(\frac{1}{R'_2} - \frac{1}{R'_2} \right)^2 + 2 \left(\frac{1}{R'_1} - \frac{1}{R'_1} \right) \left(\frac{1}{R'_2} - \frac{1}{R'_2} \right) \cos 2\alpha \right\}^{1/2} \quad \text{Gl. 8.65}$$

außerdem wird noch ein Äquivalenzradius eingeführt.

$$R_e = (R' R'')^{1/2} = \frac{1}{2} (AB)^{-1/2}$$

Gl. 8.66

Anhand der Gleichungen Gl. 8.64, Gl. 8.65 und Gl. 8.66 können nun die Konstanten A und B für Gl. 8.63 bestimmt werden. Betrachtet man beispielsweise den in Abbildung 8.20 dargestellten Zylinder, so gilt für $R'_1 = R'_2 = R$ und $R''_1 = R''_2 = \infty$ sowie $\alpha = 45^\circ$. Daraus ergibt sich aus Gl. 8.64 für $A+B$ wegen $R'' \rightarrow \infty$ für $1/R'' = 1/R'' = 0$ und wegen $R'_1 = R'_2 = R$ $A+B = 1/R$. Damit errechnet sich aus Gl. 8.65 für den Kontakt zweier Zylinder unter einem Winkel von 45° (vergl. Abbildung 8.20) für den Betrag von $A-B = 1/\sqrt{2}R$. Kombiniert man Gl. 8.64 und Gl. 8.65 ergibt sich für $B = (1 + 1/\sqrt{2})/2R$ und für $A = (1 - 1/\sqrt{2})/2R$ als Konstanten für Gl. 8.63. Für die Hauptkrümmungen der Abstandsfunktion ergibt sich dann mit Gl. 8.63 für $R' = 1/2A = 3.42R$ und für $R'' = 1/2B = 0.585R$.

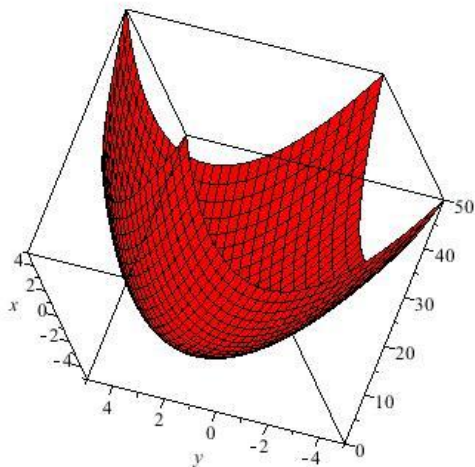


Abbildung 8.22: graphische Darstellung der Abstandsfunktion Gl. 4.42

Handelt es sich bei dem Körper, wie bei einer sphärischen Zelle während der initialen Adhäsion, um einen Rotationskörper, gilt $R_1' = R_1'' = R_1$ und $R_2' = R_2'' = R_2$ woraus folgt, dass $A = B = (1/R_1 + 1/R_2)/2$ ergibt. Die Konturen der Abstandsfunktion der jeweiligen Körper bei konstantem Abstand vor der lastbedingten Deformation sind im Ursprung des Koordinatensystems zentrierte Kreise. Gegeben durch diese Symmetrie ist die Kontaktfläche ebenfalls kreisförmig. Generell ergibt, bei beliebiger Geometrie der sich berührenden Körper, die Abstandsfunktion Gl. 8.62 eine Ellipsenschar mit Ausbreitungsrichtung entlang

der z-Achse. Unter einer Kraft F erscheint diese Kontaktfläche ebenfalls elliptisch. Ein besonderer Fall sind unter diesen Gesichtspunkten zwei Zylinder mit dem gleichen Radius R in ihrer axialen Ausbreitung senkrecht zueinander. Für die Errechnung der Abstandsfunktion h dieser Körper gilt mit $R_1' = R_2' = R$ und $R_1'' = R_2'' = \infty$ sowie $\alpha = \pi/2$, dass für die positiven Konstanten aus Gl. 8.62 sich $A = B = 1/2R$ entsprechen. Unter diesen Umständen ist die Kontur der Abstandsfunktion eine Kreisfläche, die sich in einer Ebene ausbreitet. Diese Situation ist ebenfalls für eine Kugel eines Durchmessers R ($R_1' = R_1'' = R$), die mit einer ebenen Oberfläche ($R_2' = R_2'' = \infty$) in Kontakt tritt, gültig und beschreibt damit den SCFS-Experimenten zu Grunde liegenden Versuchsaufbau bei der rheologischen Zellcharakterisierung.

Abbildung 8.23 zeigt zwei Körper unter Verformung einer Kraft F entlang der Normalen. Vor der lastbedingten Deformation weisen das Punktepaar $S_1(x, y, z_1)$ und $S_2(x, y, z_2)$ auf den jeweiligen Körperoberflächen einen Abstand h auf, der durch Gl. 8.62 definiert ist. Gegeben durch die Symmetrie dieser Gleichung wächst die Kontaktregion zwischen den Körpern unter der beschriebenen Krafteinwirkung gleichmäßig um den Ursprung auf der xy-Ebene. Unter der Krafteinwirkung P nähern sich die Punkte T_1 und T_2 entlang der z-Achse um den Betrag δ_1 und δ_2 auf den Ursprung des Koordinatenkreuzes zu. Abbildung 8.23 zeigt mittels der gestrichelten Linien das Überlappen beider Körper unter der genannten Krafteinwirkung. Relativ zu den gestrichelten Linien verformen sich die Körper unter der wirksamen Kraft P parallel zur z-Achse um den Betrag u_{z1} bzw. u_{z2} (positiv in Richtung des jeweiligen Körpermittelpunktes) relativ zu den Distanzmarken T_1 und T_2 . Nach der Deformation gilt für das Punktepaar

$$u_{z1} + u_{z2} + h = \delta_1 + \delta_2 \quad \text{Gl. 8.67}$$

Mit $\delta = \delta_1 + \delta_2$ und unter Verwendung von Gl. 8.62 ergibt sich der Ausdruck

$$u_{z1} + u_{z2} = \delta - Ax^2 - By^2 \quad \text{Gl. 8.68}$$

wobei x und y die gemeinsamen Koordinaten für $S_1(x, y, z_1)$ und $S_2(x, y, z_2)$ projiziert auf die xy -Ebene darstellen. Liegen S_1 und S_2 außerhalb der Kontaktfläche der sich berührenden Körper, gilt

$$u_{z1} + u_{z2} > \delta - Ax^2 - By^2 \quad \text{Gl. 8.69}$$

An Hand der Gleichungen Gl. 8.68 und Gl. 8.69 kann ermittelt werden, je nach Gültigkeitsbereich der Gleichung, bei welcher Kraft F ein Punktepaar $S(x, y, z)$ außerhalb bzw. innerhalb der Kontaktfläche beider Körper liegt.

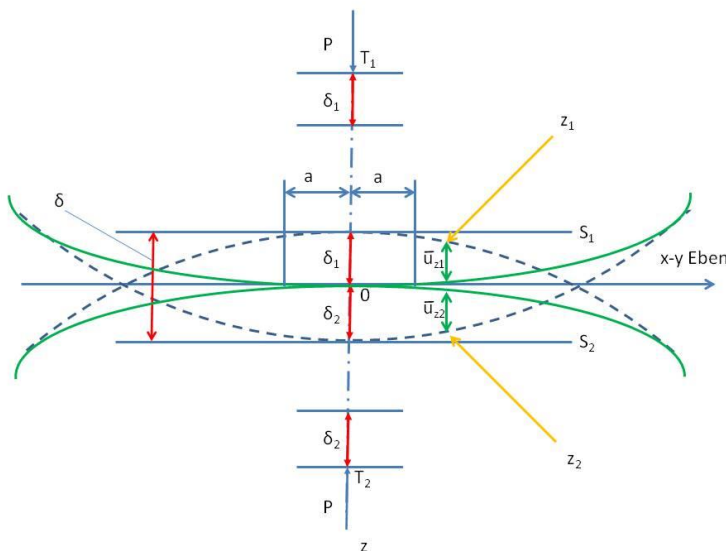


Abbildung 8.23: Pressung zweier sphärischer Körper gleichen Ausmaßes und gleicher Materialeigenschaften, modifiziert nach Johnson (1985)

Unter Krafteinwirkung normal zur xy -Ebene, d.h. entlang der z -Achse, wächst die Spannung im Körper und führt zu seiner Deformation, die wiederum eine Vergrößerung der Kontaktfläche beider Körper nach sich zieht. Um die SCFS-Experimente zutreffend zu beschreiben, wird bei der folgenden Diskussion des Hertzschen Modells, zur Beschreibung des Sachverhaltes ausschließlich die Situation

radialsymmetrischer Rotationskörper geschildert, die, gegeben durch ihre Abstandsfunktion h (Gl. 8.62), zueinander eine kreisförmige Kontaktfläche mit dem Radius a bilden. Aus Abbildung 8.23 ergibt sich, dass $\delta_1 = u_{z1}(0)$ und $\delta_2 = u_{z2}(0)$ ist. Schreibt man Gl. 8.67 nicht parametrisch, normiert mit dem jeweiligen Durchmesser a der Kontaktfläche, in der Form:

$$\left\{ \frac{u_{z1}(0)}{a} - \frac{u_{z1}(x)}{a} \right\} + \left\{ \frac{u_{z2}(0)}{a} - \frac{u_{z2}(x)}{a} \right\} = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) x^2 / a \quad \text{Gl. 8.70}$$

Für $x = a$, d.h. in diesem Fall diejenige Deformation $u(x)$ des Körpers, die gegeben durch den Punkt $S(x, y, z)$ die Länge des Radius a widerspiegelt, und $u_z(0) - u_z(a) = d$, kann die Veränderung der Kontaktzone, charakterisiert durch ihren Durchmesser a , als

$$\frac{d_1}{a} + \frac{d_2}{a} = \frac{a}{2} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad \text{Gl. 8.71}$$

geschrieben werden. Ist die Deformation sehr klein, d.h. $d \ll a$, dann gilt für die Spannung innerhalb des Körpers der Quotient d/a . Die linke Seite von Gl. 8.71 beschreibt demnach die Spannung innerhalb der beiden Körper. Die Größenordnung der Spannung ist proportional zu dem Druck p , vermittelt durch die Kraft F normal zur Fläche xy und wirksam auf die beiden Körper (Timoshenko and Gere, 2002), dividiert durch den jeweiligen Elastizitätsmodul. Sieht man p_m als durchschnittlichen Druck wirksam auf die sich gegenseitig berührenden Kontaktflächen an, ergibt sich:

$$\frac{p_m}{E_1} + \frac{p_m}{E_2} \propto a \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad \text{Gl. 8.72}$$

d.h.

$$p_m \propto \frac{a(1/R_1 + 1/R_2)}{1/E_1 + 1/E_2} \quad \text{Gl. 8.73}$$

Folglich ist für eine gegebene Geometrie und ein definiertes Material die Größe des Drucks p_m direkt proportional zu dem Radius a der Kontaktfläche beider Körper.

Im Falle von Rotationskörpern oder sphärischen Körpern errechnete sich die zur Kompression des Körpers führende Kraft F aus $F = \pi a^2 p_m$ (Hertz, 1888; Johnson, 1985; Timoshenko and Gere, 2002). Aus Gl. 8.73 ergibt sich

$$a \propto \left\{ F \left(\frac{1}{E_1} + \frac{1}{E_2} \right) / \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \right\}^{1/3} \quad \text{Gl. 8.74}$$

und

$$p_m \propto \left\{ F \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^2 / \left(\frac{1}{E_1} + \frac{1}{E_2} \right)^2 \right\}^{1/3} \quad \text{Gl. 8.75}$$

Nach Gl. 8.74 und Gl. 8.75 ist der Radius a der zirkulären Kontaktfläche und der Druck p_m proportional zu der Kubikwurzel der Kraft F . Setzt man in einem dreidimensionalen Körper die Kompressionen δ_I

und δ_2 (Abbildung 8.23) und die lokalen Vertiefungen d_1 und d_2 als korrespondierende Punkte in Zusammenhang, verhalten sie sich bei Deformation proportional zu einander.

$$\delta = \delta_1 + \delta_2 \propto d_1 + d_2 \propto \left\{ F^2 \left(\frac{1}{E_1} + \frac{1}{E_2} \right)^2 \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \right\}^{1/3} \quad \text{Gl. 8.76}$$

Die Annäherung zweier Körper auf Grund ihrer elastischen Kompression ist nach Gl. 8.76 proportional zu der Kraft $F^{2/3}$.

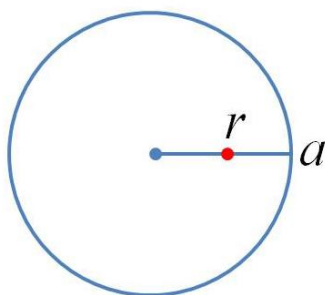
Für eine genaue Berechnung der gegenseitigen Druckverteilung in den Kontaktflächen der jeweiligen Körper müssen die Randbedingungen von Gl. 8.68 und Gl. 8.69 erfüllt sein, d.h. es muss bekannt sein, ob eine Verformung entlang der z-Achse (normal zu xy) innerhalb der Kontaktfläche (Gl. 8.68) oder außerhalb der Kontaktfläche (Gl. 8.69) stattfindet. Im Fall eines Rotationskörpers gilt $R'_1 = R''_1 = R_1$; $R'_2 = R''_2 = R_2$. Wie erwähnt, wird die Kontaktfläche beider Körper kreisförmig sein. Wie beschrieben gilt ebenfalls $A = B = \frac{1}{2}(1/R_1 + 1/R_2)$. Formulieren wir für $1/R = (1/R_1 + 1/R_2)$ lässt sich die Randbedingung für Verformungen normal zur xy-Ebene und innerhalb der Kontaktfläche als

$$u_{z1} + u_{z2} = \delta - \left(\frac{1}{2R} \right) \cdot r^2 \quad \text{Gl. 8.77}$$

darstellen, wobei r einen Punkt entlang des Radius a innerhalb der Kontaktfläche ist ($r \leq a$, Abbildung 8.24). Eine Verteilung des Druckes p , die die Forderungen von Gl. 8.77 erfüllt, ist durch den Hertz-Druck gegeben.

$$p = p_0 \left\{ 1 - \left(\frac{r}{a} \right)^2 \right\}^{1/2} \quad \text{Gl. 8.78}$$

Kontaktfläche



Gl. 8.78 führt zu Verformungen entlang der Normalen, die nach

Abbildung 8.24: Graphische Verdeutlichung der Lage des Punktes r

$$u_z = \frac{1-\nu^2}{E} \frac{\pi p_0}{4a} (2a^2 - r^2) \quad \text{Gl. 8.79}$$

für $r \leq a$ erklärt werden kann (Johnson, 1985; Fischer-Cripps, 2000). Da die Wirkung des Drucks auf beide Körper gleich ist, gilt

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \quad \text{Gl. 8.80}$$

Durch Einsetzen von Gl. 8.79 in Gl. 8.77 erhält man

$$a = \left(\frac{3FR}{4E^*} \right)^{1/3} \quad \text{Gl. 8.85}$$

$$\delta = \frac{a^2}{R} = \left(\frac{9F^2}{16RE^{*2}} \right)^{1/3} \quad \text{Gl. 8.86}$$

$$p_0 = \frac{3P}{2\pi a^2} = \left(\frac{6FE^{*2}}{\pi^3 R^2} \right)^{1/3} \quad \text{Gl. 8.87}$$

$$\frac{\pi p_0}{4aE^*} (2a^2 - r^2) = \delta - \left(\frac{1}{2R} \right) \cdot r^2 \quad \text{Gl. 8.81}$$

Aus dieser Gleichung ergibt sich für den Radius a

$$a = \frac{\pi p_0 R}{2E^*} \quad \text{Gl. 8.82}$$

und für die gegenseitige Annäherung zweier Punkte δ innerhalb der jeweiligen Körper

$$\delta = \frac{\pi a p_0}{2E^*} \quad \text{Gl. 8.83}$$

Betrachtet man die Kraft F , die zur Verformung der Körper führt, ergibt sich ein Zusammenhang zum jeweiligen Druck $p(r)$ aus

$$P = \int_0^a p(r) 2\pi r dr = \frac{2}{3} p_0 \pi a^2 \quad \text{Gl. 8.84}$$

Setzt man Gl. 8.82 und Gl. 8.83 in Gl. 8.84 ein, erhält man die für das Hertz-Modell typischen Aussagen für a , δ und p_0

Die Gleichungen Gl. 8.85, Gl. 8.86 und Gl. 8.87 haben die selbe Aussage wie die Gleichungen Gl. 8.74, Gl. 8.75 und Gl. 8.76 aus den aufgeführten geometrischen Überlegungen.

9 Literaturverzeichnis

- Ahmed, I., Collins, C.A., Lewis, M.P., Olsen, I., and Knowles, J.C. (2004a). Processing, characterisation and biocompatibility of iron-phosphate glass fibres for tissue engineering. *Biomaterials* 25, 3223–3232.
- Ahmed, I., Lewis, M., Olsen, I., and Knowles, J.C. (2004b). Phosphate glasses for tissue engineering: Part 1. Processing and characterisation of a ternary-based P2O5–CaO–Na2O glass system. *Biomaterials* 25, 491–499.
- Ahmed, I., Lewis, M., Olsen, I., and Knowles, J.C. (2004c). Phosphate glasses for tissue engineering: Part 2. Processing and characterisation of a ternary-based P2O5–CaO–Na2O glass fibre system. *Biomaterials* 25, 501–507.
- Alberts, B., Johnson, A., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2008). *Molecular biology of the cell* (New York: Garland Science).
- Albrecht, D.R., Underhill, G.H., Wassermann, T.B., Sah, R.L., and Bhatia, S.N. (2006). Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. *Nat Meth* 3, 369–375.
- Algranati, I.D., and Goldemberg, S.H. (1977). Polyamines and their role in protein synthesis. *Trends in Biochemical Sciences* 2, 272–274.
- Anselme, K. (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21, 667–681.
- Anselme, K., Bigerelle, M., Noel, B., Dufresne, E., Judas, D., Iost, A., and Hardouin, P. (2000). Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *Journal of Biomedical Materials Research* 49, 155–166.
- Aota, S., Nagai, T., and Yamada, K.M. (1991). Characterization of regions of fibronectin besides the arginine-glycine-aspartic acid sequence required for adhesive function of the cell-binding domain using site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 266, 15938–15943.
- Appella, E., and Markert, C.L. (1961). Dissociation of lactate dehydrogenase into subunits with guanidine hydrochloride. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 6, 171–176.
- Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* 284, 770–776.
- Bacabac, R.G., Mizuno, D., Schmidt, C.F., MacKintosh, F.C., Van Loon, J.J.W.A., Klein-Nulend, J., and Smit, T.H. (2008). Round versus flat: Bone cell morphology, elasticity, and mechanosensing. *Journal of Biomechanics* 41, 1590–1598.
- Barkalow, F.J., and Schwarzbauer, J.E. (1991). Localization of the major heparin-binding site in fibronectin. *Journal of Biological Chemistry* 266, 7812–7818.
- Beard, R., Hung, B., and Schmukler, R. (1992). Biocompatibility considerations at stimulating electrode interfaces. *Annals of Biomedical Engineering* 20, 395–410.
- Becker, R.O., and Spadaro, J.A. (1972). Electrical stimulation of partial limb regeneration in mammals. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 48, 627.
- Bell, G.I. (1978). Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* 200, 618.
- Benoit, M., Gabriel, D., Gerisch, G., and Gaub, H.E. (2000). Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat Cell Biol* 2, 313–317.
- Bentley, K.L., Klebe, R.J., Hurst, R.E., and Horowitz, P.M. (1985). Heparin binding is necessary, but not sufficient, for fibronectin aggregation. A fluorescence polarization study. *Journal of Biological Chemistry* 260, 7250–7256.
- Best, R.B., Brockwell, D.J., Toca-Herrera, J.L., Blake, A.W., Smith, D.A., Radford, S.E., and Clarke, J. (2003). Force mode atomic force microscopy as a tool for protein folding studies. *Analytica Chimica Acta* 479, 87–105.
- Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C. (1986). Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930–933.
- Binnig, G., and Rohrer, H. (1983). Scanning tunneling microscopy. *Surface Science* 126, 236–244.
- Bohinc, K., Iglic, A., and May, S. (2004). Interaction between macroions by divalent rod-like ions. *EPL* 68, 494–500.
- Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D., and Schwartz, Z. (1996). Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 17, 137–146.
- Breme, Thull, R., and Kirkpatrick, C.J. (2008). *Metallic Biomaterial Interfaces* (Weinheim: Wiley-VCH).
- Brighton, C.T., Fisher, J., Levine, S.E., Corsetti, J.R., Reilly, T., Landsman, A.S., WILLIAMS, J.L., and THIBAUT, L.E. (1996). The Biochemical Pathway Mediating the Proliferative Response of Bone Cells to a Mechanical Stimulus*. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 78, 1337–1347.
- Brown, T.D. (2000). Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *Journal of Biomechanics* 33, 3–14.
- Bueche, F. (1962). *Physical Properties of Polymers* (New York: Interscience Publishers).
- Buehler, S.M., Stubbe, M., Gimsa, U., Baumann, W., and Gimsa, J. (2011). A decrease of intracellular ATP is compensated by increased respiration and acidification at sub-lethal parathion concentrations in murine embryonic neuronal cells: Measurements in metabolic cell-culture chips. *Toxicology Letters* 207, 182–190.
- Bustanji, Y., Arciola, C.R., Conti, M., Mandello, E., Montanaro, L., and Samorì, B. (2003). Dynamics of the interaction between a fibronectin molecule and a living bacterium under mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 13292–13297.
- Butt, H.-J. (1994). A Technique for Measuring the Force between a Colloidal Particle in Water and a Bubble. *Journal of Colloid and Interface Science* 166, 109–117.
- Butt, H.J., and Jaschke, M. (1999). Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology* 6, 1.

- Byfield, F.J., Aranda-Espinoza, H., Romanenko, V.G., Rothblat, G.H., and Levitan, I. (2004). Cholesterol Depletion Increases Membrane Stiffness of Aortic Endothelial Cells. *Biophysical Journal* 87, 3336–3343.
- Cai, K., Bossert, J., and Jandt, K.D. (2006). Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 49, 136–144.
- Cantor, C.R., and Schimmel, P.R. (2001). *Biophysical Chemistry Part II: Techniques for the study of biological structure and function* (New York: W.H. Freeman and Company).
- Capila, I., and Linhardt, R.J. (2002). Heparin–Protein Interactions. *Angewandte Chemie International Edition* 41, 390–412.
- Carrion-Vazquez, M., Li, H., Lu, H., Marszalek, P.E., Oberhauser, A.F., and Fernandez, J.M. (2003). The mechanical stability of ubiquitin is linkage dependent. *Nat Struct Biol* 10, 738–743.
- Carrion-Vazquez, M., Oberhauser, A.F., Fisher, T.E., Marszalek, P.E., Li, H., and Fernandez, J.M. (2000). Mechanical design of proteins studied by single-molecule force spectroscopy and protein engineering. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 74, 63–91.
- Carrion-Vazquez, M., Oberhauser, A.F., Fowler, S.B., Marszalek, P.E., Broedel, S.E., Clarke, J., and Fernandez, J.M. (1999a). Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3694.
- Carrion-Vazquez, M., Oberhauser, A.F., Fowler, S.B., Marszalek, P.E., Broedel, S.E., Clarke, J., and Fernandez, J.M. (1999b). Mechanical and chemical unfolding of a single protein: A comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 3694–3699.
- Carter, W.G., Rauvala, H., and Hakomori, S.I. (1981). Studies on cell adhesion and recognition. II. The kinetics of cell adhesion and cell spreading on surfaces coated with carbohydrate-reactive proteins (glycosidases and lectins) and fibronectin. *The Journal of Cell Biology* 88, 138–148.
- Chabanel, A., Flamm, M., Sung, K.L., Lee, M.M., Schachter, D., and Chien, S. (1983). Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. *Biophysical Journal* 44, 171–176.
- Chapman, D.L. (1913). LI. A contribution to the theory of electrocapillarity. *Philosophical Magazine Series 6* 25, 475–481.
- Chattopadhyay, M.K., Tabor, C.W., and Tabor, H. (2003). Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 2261–2265.
- Chattopadhyay, M.K., Tabor, C.W., and Tabor, H. (2009). Polyamines Are Not Required for Aerobic Growth of *Escherichia coli*: Preparation of a Strain with Deletions in All of the Genes for Polyamine Biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 191, 5549–5552.
- Chen, S., and Springer, T.A. (2001). Selectin receptor–ligand bonds: Formation limited by shear rate and dissociation governed by the Bell model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 950–955.
- Cheresh, D.A., Smith, J.W., Cooper, H.M., and Quaranta, V. (1989). A novel vitronectin receptor integrin ($\alpha v \beta 3$) is responsible for distinct adhesive properties of carcinoma cells. *Cell* 57, 59–69.
- Cherny, R.C., Honan, M.A., and Thiagarajan, P. (1993). Site-directed mutagenesis of the arginine-glycine-aspartic acid in vitronectin abolishes cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry* 268, 9725–9729.
- Chesla, S.E., Selvaraj, P., and Zhu, C. (1998). Measuring Two-Dimensional Receptor-Ligand Binding Kinetics by Micropipette. *Biophysical Journal* 75, 1553–1572.
- Christenson, H.K. (1984). DLVO (Derjaguin?Landau?Verwey?Overbeek) theory and solvation forces between mica surfaces in polar and hydrogen-bonding liquids. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 1 80, 1933.
- Chung, T.-W., Liu, D.-Z., Wang, S.-Y., and Wang, S.-S. (2003). Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. *Biomaterials* 24, 4655–4661.
- Clausen-Schaumann, H., Seitz, M., Krautbauer, R., and Gaub, H.E. (2000). Force spectroscopy with single bio-molecules. *Current Opinion in Chemical Biology* 4, 524–530.
- Cohn, M.S., Tabor, C.W., Tabor, H., and Wickner, R.B. (1978). Spermidine or Spermine Requirement for Killer Double-stranded RNA Plasmid Replication in Yeast. *J. Biol. Chem.* 253, 5225–5227.
- Cooper, C., Campion, G., and Melton, L.J. (1992). Hip fractures in the elderly: A world-wide projection. *Osteoporosis International* 2, 285–289.
- Couchman, J.R., Austria, M.R., and Woods, A. (1990). Fibronectin-Cell Interactions. *J Invest Dermatol* 94, 7s–14s.
- Cowley, A.C., Fuller, N.L., Rand, R.P., and Parsegian, V.A. (1978). Measurement of repulsive forces between charged phospholipid bilayers. *Biochemistry* 17, 3163–3168.
- Curtis, A.S., Forrester, J.V., McInnes, C., and Lawrie, F. (1983). Adhesion of cells to polystyrene surfaces. *The Journal of Cell Biology* 97, 1500–1506.
- Dai, J., and Sheetz, M.P. (1997). Chapter 9 Cell Membrane Mechanics. (Academic Press), pp. 157–171.
- Dalton, B.A., McFarland, C.D., Underwood, P.A., and Steele, J.G. (1995). Role of the heparin binding domain of fibronectin in attachment and spreading of human bone-derived cells. *Journal of Cell Science* 108, 2083–2092.
- Degasne, I., Baslé, M.F., Demais, V., Huré, G., Lesourd, M., Grolleau, B., Mercier, L., and Chappard, D. (1999). Effects of Roughness, Fibronectin and Vitronectin on Attachment, Spreading, and Proliferation of Human Osteoblast-Like Cells (Saos-2) on Titanium Surfaces. *Calcified Tissue International* 64, 499–507.
- Deligianni, D.D., Katsala, N.D., Koutsoukos, P.G., and Missirlis, Y.F. (2000). Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials* 22, 87–96.

- Dembo, M., Torney, D.C., Saxman, K., and Hammer, D. (1988). The Reaction-Limited Kinetics of Membrane-to-Surface Adhesion and Detachment. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 234, 55–83.
- Derjaguin, B., and Landau, L. (1993). Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Progress in Surface Science* 43, 30–59.
- Dewez, J.-L., Doren, A., Schneider, Y.-J., and Rouxhet, P.G. (1999). Competitive adsorption of proteins: Key of the relationship between sub-stratum surface properties and adhesion of epithelial cells. *Biomaterials* 20, 547–559.
- Dietz, H., and Rief, M. (2006). Protein structure by mechanical triangulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1244–1247.
- Dintwa, E., Tijskens, E., and Ramon, H. (2008). On the accuracy of the Hertz model to describe the normal contact of soft elastic spheres. *Granular Matter* 10, 209–221.
- Donath, E., and Gingell, D. (1983). A sharp cell surface conformational transition at low ionic strength changes the nature of the adhesion of enzyme-treated red blood cells to a hydrocarbon interface. *Journal of Cell Science* 63, 113–124.
- Donath, E., and Voigt, A. (1986). Electrophoretic mobility of human erythrocytes. On the applicability of the charged layer model. *Biophysical Journal* 49, 493–499.
- Dozza, B., Di Bella, C., Lucarelli, E., Giavaresi, G., Fini, M., Tazzari, P.L., Giannini, S., and Donati, D. (2011). Mesenchymal stem cells and platelet lysate in fibrin or collagen scaffold promote non-cemented hip prosthesis integration. *Journal of Orthopaedic Research* 29, 961–968.
- Ebel, H., Grabitz, P., and Heimbürg, T. (2001). Enthalpy and Volume Changes in Lipid Membranes. I. The Proportionality of Heat and Volume Changes in the Lipid Melting Transition and Its Implication for the Elastic Constants \ddagger . *J. Phys. Chem. B* 105, 7353–7360.
- Edel, H. (1985). Die Knochenstimulation mit dem elektrischen und magnetischen Feld - ein Wissenschaftsgebiet im Gespräch. *Übersichtsreferat* 1. *Phys Rehab Kur Med* 37, 383–390.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Buttner, S., Ruckstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., et al. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 11, 1305–1314.
- Eliceiri, B.P., and Cheres, D.A. (1999). The role of αv integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 103, 1227–1230.
- Elter, P., Lange, R., and Beck, U. (2011). Electrostatic and Dispersion Interactions during Protein Adsorption on Topographic Nanostructures. *Langmuir* 27, 8767–8775.
- Elter, P., Sickel, F., and Ewald, A. (2009). Nanoscaled periodic surface structures of medical stainless steel and their effect on osteoblast cells. *Acta Biomaterialia* 5, 1468–1473.
- Elter, P., Weihe, T., Bühler, S., Gimsa, J., and Beck, U. (2012). Low fibronectin concentration overcompensates for reduced initial fibroblasts adhesion to a nanoscale topography: Single-cell force spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 95, 82–89.
- Elter, P., Weihe, T., Lange, R., Gimsa, J., and Beck, U. (2010). The influence of topographic microstructures on the initial adhesion of L929 fibroblasts studied by single-cell force spectroscopy. *European Biophysics Journal* 40, 317–327.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126, 677–689.
- Erickson, H.P. (1994). Reversible unfolding of fibronectin type III and immunoglobulin domains provides the structural basis for stretch and elasticity of titin and fibronectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10114–10118.
- Evans, C.W. (1992). Cell adhesion and metastasis. *Cell Biology International Reports* 16, 1–10.
- Evans, E., and Needham, D. (1987). Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions. *J. Phys. Chem.* 91, 4219–4228.
- Evans, E., and Ritchie, K. (1997). Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophysical Journal* 72, 1541–1555.
- Evans, E., and Yeung, A. (1989). Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. *Biophysical Journal* 56, 151–160.
- Ezzell, R.M., Goldmann, W.H., Wang, N., Parasharama, N., and Ingber, D.E. (1997). Vinculin Promotes Cell Spreading by Mechanically Coupling Integrins to the Cytoskeleton. *Experimental Cell Research* 231, 14–26.
- Field, E.A., and Martin, M.V. (1991). Prophylactic antibiotics for patients with artificial joints undergoing oral and dental surgery: necessary or not? *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 29, 341–346.
- Fierro, F.A., Taubenberger, A., Puech, P.-H., Ehninger, G., Bornhauser, M., Müller, D.J., and Illmer, T. (2008). BCR/ABL Expression of Myeloid Progenitors Increases $\beta 1$ -Integrin Mediated Adhesion to Stromal Cells. *Journal of Molecular Biology* 377, 1082–1093.
- Fikus, M., and Pawlowski, P. (1989). Bioelectrorheological model of the cell. 2. Analysis of creep and its experimental verification. *Journal of Theoretical Biology* 137, 365–373.
- Fischer-Cripps, A.C. (2000). *Introduction to Contact Mechanics* (New York: Springer).
- Fisher, T.E., Marszalek, P.E., and Fernandez, J.M. (2000). Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope. *Nat Struct Biol* 7, 719–724.
- Flieger, J., Karachalios, T., Khaldi, L., Raptou, P., and Lyritis, G. (1998). Mechanical Stimulation in the Form of Vibration Prevents Postmenopausal Bone Loss in Ovariectomized Rats. *Calcified Tissue International* 63, 510–514.
- Flügge, W. (1967). *Viscoelasticity* (Waltham, Massachusetts: Blaisdell Publishing Company).

- Fowler, S.B., Best, R.B., Toca Herrera, J.L., Rutherford, T.J., Steward, A., Paci, E., Karplus, M., and Clarke, J. (2002). Mechanical Unfolding of a Titin Ig Domain: Structure of Unfolding Intermediate Revealed by Combining AFM, Molecular Dynamics Simulations, NMR and Protein Engineering. *Journal of Molecular Biology* 322, 841–849.
- Frank, M., Manček-Keber, M., Kržan, M., Sodin-Šemrl, S., Jerala, R., Iglič, A., Rozman, B., and Kralj-Iglič, V. (2008). Prevention of microvesiculation by adhesion of buds to the mother cell membrane — A possible anticoagulant effect of healthy donor plasma. *Autoimmunity Reviews* 7, 240–245.
- Franz, C., and Puech, P.-H. (2008). Atomic Force Microscopy: A Versatile Tool for Studying Cell Morphology, Adhesion and Mechanics. *Cellular and Molecular Bioengineering* 1, 289–300.
- Franz, C.M., Taubenberger, A., Puech, P.-H., and Muller, D.J. (2007). Studying Integrin-Mediated Cell Adhesion at the Single-Molecule Level Using AFM Force Spectroscopy. *Sci. STKE* 2007, pl5.
- Frost, H.M. (1990a). Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's Law: The bone modeling problem. *The Anatomical Record* 226, 403–413.
- Frost, H.M. (1990b). Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's Law: The remodeling problem. *The Anatomical Record* 226, 414–422.
- Frost, H.M. (1990c). Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 3. The hyaline cartilage modeling problem. *The Anatomical Record* 226, 423–432.
- Frost, H.M. (1990d). Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 4. Mechanical influences on intact fibrous tissues. *The Anatomical Record* 226, 433–439.
- Fuard, D., Tzvetkova-Chevolleau, T., Decossas, S., Tracqui, P., and Schiavone, P. (2008). Optimization of poly-di-methyl-siloxane (PDMS) substrates for studying cellular adhesion and motility. *Microelectronic Engineering* 85, 1289–1293.
- Fukada, E., and Yasuda, I. (1954). On the Piezoelectric Effect of Bone. *J. Phys. Soc. Jpn.* 12, 1158.
- Galli, C., Collaud Coen, M., Hauert, R., Katanaev, V.L., Wymann, M.P., Gröning, P., and Schlapbach, L. (2001). Protein adsorption on topographically nanostructured titanium. *Surface Science* 474, L180–L184.
- Gao, M., Craig, D., Lequin, O., Campbell, I.D., Vogel, V., and Schulten, K. (2003). Structure and functional significance of mechanically unfolded fibronectin type III1 intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 14784–14789.
- García, A.J., Ducheyne, P., and Boettiger, D. (1998). Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *Journal of Biomedical Materials Research* 40, 48–56.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K.M. (2001a). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 793–805.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K.M. (2001b). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 793–805.
- Gerecht, S., Bettinger, C.J., Zhang, Z., Borenstein, J.T., Vunjak-Novakovic, G., and Langer, R. (2007). The effect of actin disrupting agents on contact guidance of human embryonic stem cells. *Biomaterials* 28, 4068–4077.
- Gimsa, J., and Ried, C. (1995). Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? *Molecular Membrane Biology* 12, 247–254.
- Gimsa, U., and Gimsa, J. (1997). Determination of viral neuraminidase specificity for membrane-bound sialic acids by cell electrophoresis. *Molecular Membrane Biology* 14, 87–90.
- Gongadze, E., Bohinc, K., van Rienen, U., Kralj-Iglič, V., and Iglič, A. (2010). Chapter Five - Spatial Variation of Permittivity near a Charged Membrane in Contact with Electrolyte Solution. In *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Aleš Iglič, ed. (Academic Press), pp. 101–126.
- Göpel, W., and Wiemhöfer, H.-D. (2000). *Statistische Thermodynamik* (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
- Gospodarowicz, D., Delgado, D., and Vlodavsky, I. (1980). Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77, 4094–4098.
- Gouy, L.G. (1910). Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte. *J. Phys* 9, 457–468.
- Grahame, D.C. (1953). Diffuse Double Layer Theory for Electrolytes of Unsymmetrical Valence Types. *The Journal of Chemical Physics* 21, 1054.
- Grant, R.P., Spitzfaden, C., Altroff, H., Campbell, I.D., and Mardon, H.J. (1997). Structural Requirements for Biological Activity of the Ninth and Tenth FIII Domains of Human Fibronectin. *Journal of Biological Chemistry* 272, 6159–6166.
- Greene, R.F., and Pace, C.N. (1974). Urea and Guanidine Hydrochloride Denaturation of Ribonuclease, Lysozyme, α -Chymotrypsin, and β -Lactoglobulin. *Journal of Biological Chemistry* 249, 5388–5393.
- Grinnell, F., and Feld, M.K. (1981). Adsorption characteristics of plasma fibronectin in relationship to biological activity. *J. Biomed. Mater. Res.* 15, 363–381.
- Guilak, F., Jones, W.R., Ting-Beall, H.P., and Lee, G.M. (1999). The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 7, 59–70.
- Guldbrand, L., Jönsson, B., Wennerström, H., and Linse, P. (1984). Electrical double layer forces. A Monte Carlo study. *The Journal of Chemical Physics* 80, 2221.
- Ha, H.C., Sirisoma, N.S., Kuppusamy, P., Zweier, J.L., Woster, P.M., and Casero, R.A. (1998). The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 11140–11145.

- Hägerstrand, H., Danieluk, M., Bobrowska-Hägerstrand, M., Iglič, A., Wróbel, A., Isomaa, B., and Nikinmaa, M. (2000). Influence of band 3 protein absence and skeletal structures on amphiphile- and Ca^{2+} -induced shape alterations in erythrocytes: a study with lamprey (*Lampetra fluviatilis*), trout (*Onchorhynchus mykiss*) and human erythrocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1466, 125–138.
- Hallab, N., Bundy, K., O'Connor, K., Clark, R., and Moses, R. (1995). Cell adhesion to biomaterials: correlations between surface charge, surface roughness, adsorbed protein, and cell morphology. *J Long Term Eff Med Implants* 5, 209–231.
- Hallab, N., Bundy, K., O'Connor, K., Moses, R., and Jacobs, J. (2001). Evaluation of Metallic and Polymeric Biomaterial Surface Energy and Surface Roughness Characteristics for Directed Cell Adhesion. *Tissue Engineering* 7, 55–71.
- Hamann, C.H., and Vielstich, W. (2005). *Elektrochemie* (Weinheim: Wiley-VCH).
- Hamid, S., and Hayek, R. (2008). Role of electrical stimulation for rehabilitation and regeneration after spinal cord injury: an overview. *European Spine Journal* 17, 1256–1269.
- Hammer, D.A., and Lauffenburger, D.A. (1987). A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces. *Biophysical Journal* 52, 475–487.
- Hanfrey, C.C., Pearson, B.M., Hazeldine, S., Lee, J., Gaskin, D.J., Woster, P.M., Phillips, M.A., and Michael, A.J. (2011). Alternative Spermidine Biosynthetic Route Is Critical for Growth of *Campylobacter jejuni* and Is the Dominant Polyamine Pathway in Human Gut Microbiota. *Journal of Biological Chemistry* 286, 43301–43312.
- Haramé, D.L., Bousse, L.J., Shott, J.D., and Meindl, J.D. (1987). Ion-sensing devices with silicon nitride and borosilicate glass insulators. *Electron Devices, IEEE Transactions On* 34, 1700–1707.
- Hartley, P.G., Larson, I., and Scales, P.J. (1997). Electrokinetic and direct force measurements between silica and mica surfaces in dilute electrolyte solutions. *Langmuir* 13, 2207–2214.
- Hassan, P.A., Valaulikar, B.S., Manohar, C., Kern, F., Bourdieu, L., and Candau, S.J. (1996). Vesicle to Micelle Transition: Rheological Investigations. *Langmuir* 12, 4350–4357.
- Hehrlein, C., Zimmermann, M., Metz, J., Ensinger, W., and Kubler, W. (1995). Influence of surface texture and charge on the biocompatibility of endovascular stents. *Coronary Artery Disease* 6, .
- Heimburg, T. (1998). Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1415, 147–162.
- Heimburg, T. (2000). A Model for the Lipid Pretransition: Coupling of Ripple Formation with the Chain-Melting Transition. *Biophysical Journal* 78, 1154–1165.
- Heimburg, T. (2007). *Thermal Biophysics of Membranes* (Weinheim: Wiley-VCH).
- Heimburg, T., and Jackson, A.D. (2007). The Thermodynamics of General Anesthesia. *Biophysical Journal* 92, 3159–3165.
- Heipieper, H.J., Keweloh, H., and Rehm, H.J. (1991). Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1213–1217.
- Helenius, J., Heisenberg, C.-P., Gaub, H.E., and Muller, D.J. (2008). Single-cell force spectroscopy. *Journal of Cell Science* 121, 1785–1791.
- Helmholtz, H. von (1853). Studien über electrische Grenzschichten. *Pogg. Ann.* LXXXIX, 339–381.
- Henderson, D., and Blum, L. (1978). Some exact results and the application of the mean spherical approximation to charged hard spheres near a charged hard wall. *The Journal of Chemical Physics* 69, 5441–5449.
- Herak, D., Choteborsky, R., Sedlacek, A., and Janca, A. (2006). Exploitation of Hertz's contact pressures in friction drives. *Res.Agr.Eng.* 52, 107 – 114.
- Hertz, H. (1888). Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *Journal Für Die Reine Und Angewandte Mathematik* 92, 156 – 171.
- Holodniy, M., Kim, S., Katzenstein, D., Konrad, M., Groves, E., and Merigan, T.C. (1991). Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 676–679.
- Homandberg, G.A., Meyers, R., and Xie, D.L. (1992). Fibronectin fragments cause chondrolysis of bovine articular cartilage slices in culture. *Journal of Biological Chemistry* 267, 3597–3604.
- Huang, H.-H., Ho, C.-T., Lee, T.-H., Lee, T.-L., Liao, K.-K., and Chen, F.-L. (2004). Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomolecular Engineering* 21, 93–97.
- Hübler, R., Fertl, B., Hellmann, N., and Decker, H. (1998). On the stability of the 24-meric hemocyanin from *Eurypelma californicum*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1383, 327–339.
- Humphries, J.D., Byron, A., and Humphries, M.J. (2006). Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science* 119, 3901–3903.
- Hutmacher, D.W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21, 2529–2543.
- Hutter, J.L., and Bechhoefer, J. (1993). Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.* 64, 1868–1873.
- Hynes, R.O. (1987). Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 48, 549–554.
- Igarashi, K., and Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: Mysterious Modulators of Cellular Functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271, 559–564.
- Igarashi, K., Saisho, T., Yuguchi, M., and Kashiwagi, K. (1997). Molecular Mechanism of Polyamine Stimulation of the Synthesis of Oligopeptide-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 272, 4058–4064.
- IGARASHI, K., SUGAWARA, K., IZUMI, I., NAGAYAMA, C., and HIROSE, S. (1974). Effect of Polyamines on Polyphenylalanine Synthesis by *Escherichia coli* and Rat-Liver Ribosomes. *European Journal of Biochemistry* 48, 495–502.

- Iglıc, A., Gongadze, Kabaso, D., Bauer, Schmuki, P., Slivnik, and van Rienen, U. (2011). Adhesion of osteoblasts to a nanorough titanium implant surface. *International Journal of Nanomedicine* 1801.
- Ikai, A. (2008). *Einführung in die Nanobiomechanik* (Weinheim: Wiley-VCH).
- Isomaa, B., Hägerstrand, H., and Paatero, G. (1987). Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 899, 93–103.
- Israelachvili, J.N. (2011). *Intermolecular and Surface Forces* (Waltham, Massachusetts: Academic Press).
- Israelachvili, J.N., and Adams, G.E. (1978). Measurement of forces between two mica surfaces in aqueous electrolyte solutions in the range 0–100 nm. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 74, 975–1001.
- Jin, H., and Varner, J. (2004). Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *British Journal of Cancer* 90, 561–565.
- Johnson, K.L. (1985). *Contact Mechanics* (Cambridge: Cambridge University Press).
- Juliano, R.L., and Haskill, S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology* 120, 577–585.
- Kabaso, D., Gongadze, E., Perutková, Š., Matschegewski, C., Kralj-Iglič, V., Beck, U., van Rienen, U., and Iglıc, A. (2011). Mechanics and electrostatics of the interactions between osteoblasts and titanium surface. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* 14, 469–482.
- Kang, G.Y., Han, G.Y., Kang, J.Y., Cho, I.-H., Park, H.-H., Paek, S.-H., and Kim, T.S. (2006). Label-free protein assay with site-directly immobilized antibody using self-actuating PZT cantilever. *Sensors and Actuators B: Chemical* 117, 332–338.
- Karcher, H., Lammerding, J., Huang, H., Lee, R.T., Kamm, R.D., and Kaazempur-Mofrad, M.R. (2003). A Three-Dimensional Viscoelastic Model for Cell Deformation with Experimental Verification. *Biophysical Journal* 85, 3336–3349.
- Karjalainen, P.P., Ylitalo, A., Airaksinen, J.K., and Nammas, W. (2010). Titanium-nitride-oxide-coated Titan-2 bioactive coronary stent: a new horizon for coronary intervention. *Expert Rev Med Dev* 7, 599–604.
- Kawakita, M., and Hiramatsu, K. (2006). Diacetylated Derivatives of Spermine and Spermidine as Novel Promising Tumor Markers. *Journal of Biochemistry* 139, 315–322.
- Kawasaki, H., Souda, M., Tanaka, S., Nemoto, N., Karlsson, G., Almgren, M., and Maeda, H. (2002). Reversible Vesicle Formation by Changing pH. *The Journal of Physical Chemistry B* 106, 1524–1527.
- Kessler, L., Legeay, G., Coudreuse, A., Bertrand, P., Poleunus, C., Eynde, X.V., Mandes, K., Marchetti, P., Pinget, M., and Belcourt, A. (2003). Surface treatment of polycarbonate films aimed at biomedical application. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 14, 1135–1153.
- Khan, A.U., Mei, Y.H., and Wilson, T. (1992). A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 11426–11427.
- Khan, M.Y., Medow, M.S., and Newman, S.A. (1990). Unfolding transitions of fibronectin and its domains. Stabilization and structural alteration of the N-terminal domain by heparin. *Biochem. J.* 270, 33–38.
- Khan, S., Gor, J., Mulloy, B., and Perkins, S.J. (2010). Semi-Rigid Solution Structures of Heparin by Constrained X-ray Scattering Modelling: New Insight into Heparin–Protein Complexes. *Journal of Molecular Biology* 395, 504–521.
- Khang, D., Lu, J., Yao, C., Haberstroh, K.M., and Webster, T.J. (2008). The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium. *Biomaterials* 29, 970–983.
- Kienberger, F., Ebner, A., Gruber, H.J., and Hinterdorfer, P. (2006). Molecular Recognition Imaging and Force Spectroscopy of Single Biomolecules. *Accounts of Chemical Research* 39, 29–36.
- Kilic, M., Bazant, M., and Ajdari, A. (2007). Steric effects in the dynamics of electrolytes at large applied voltages. I. Double-layer charging. *Physical Review E* 75,.
- Kim, I.S., Song, J.K., Zhang, Y.L., Lee, T.H., Cho, T.H., Song, Y.M., Kim, D.K., Kim, S.J., and Hwang, S.J. (2006). Biphasic electric current stimulates proliferation and induces VEGF production in osteoblasts. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763, 907–916.
- Kimberly, M.M., and Goldstein, J.H. (1981). Determination of pKa values and total proton distribution pattern of spermidine by carbon-13 nuclear magnetic resonance titrations. *Analytical Chemistry* 53, 789–793.
- Kjellander, R., Marcelja, S., Pashley, R., and Quirk, J. (1988). Double-layer ion correlation forces restrict calcium-clay swelling. *The Journal of Physical Chemistry* 92, 6489–6492.
- Klein-Nulend, J., Roelofsen, J., Semeins, C.M., Bronckers, A.L.J.J., and Burger, E.H. (1997). Mechanical stimulation of osteopontin mRNA expression and synthesis in bone cell cultures. *J. Cell. Physiol.* 170, 174–181.
- Koester, P.J., Buehler, S.M., Stubbe, M., Tautorat, C., Niendorf, M., Baumann, W., and Gimsa, J. (2010). Modular glass chip system measuring the electric activity and adhesion of neuronal cells-application and drug testing with sodium valproic acid. *Lab Chip* 10, 1579–1586.
- König, P., Hillman, L., Cervantes, C., Levine, C., Maloney, C., Douglass, B., Johnson, L., and Allen, S. (1993). Bone metabolism in children with asthmatreated with inhaled beclomethasone dipropionate. *The Journal of Pediatrics* 122, 219–226.
- Kotz, R., Dominkus, M., Zettl, T., Ritschl, P., Windhager, R., Gadner, H., Zielinski, C., and Salzer-Kuntschik, M. (2002). Advances in bone tumour treatment in 30 years with respect to survival and limb salvage. A single institution experience. *International Orthopaedics* 26, 197–202.
- Krammer, A., Craig, D., Thomas, W.E., Schulten, K., and Vogel, V. (2002). A structural model for force regulated integrin binding to fibronectin's RGD-synergy site. *Matrix Biology* 21, 139–147.
- Krammer, A., Lu, H., Israilewitz, B., Schulten, K., and Vogel, V. (1999). Forced unfolding of the fibronectin type III module reveals a tensile molecular recognition switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1351–1356.

- Kratky, O., and Porod, G. (1949). Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle. *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas* 68, 1106–1122.
- Krieg, M., Arboleda-Estudillo, Y., Puech, P.-H., Kafer, J., Graner, F., Muller, D.J., and Heisenberg, C.-P. (2008). Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nat Cell Biol* 10, 429–436.
- Kunzler, T.P., Drobek, T., Schuler, M., and Spencer, N.D. (2007). Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials* 28, 2175–2182.
- Lago, N., Yoshida, K., Koch, K.P., and Navarro, X. (2007). Assessment of Biocompatibility of Chronically Implanted Polyimide and Platinum Intrafascicular Electrodes. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions On* 54, 281–290.
- Lai, J.C., Lai, M.B., Jandhyam, S., Dukhande, V.V., Bhushan, A., Daniels, C.K., and Leung, S.W. (2008). Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neuronal cells and fibroblasts. *International Journal of Nanomedicine* 3, 533–545.
- Lampin, M., Warocquier-Clérout, R., Legris, C., Degrange, M., and Sigot-Luizard, M.F. (1997). Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *Journal of Biomedical Materials Research* 36, 99–108.
- Lange, R., Elter, P., Biala, K., Matschegewski, C., Staehlke, S., Löffler, R., Fleischer, M., Nebe, B.J., Kern, D.P., and Beck, U. (2010). Titanium surfaces structured with regular geometry-material investigations and cell morphology. *Surface and Interface Analysis* 42, 497–501.
- Leahy, D.J., Aukhil, I., and Erickson, H.P. (1996). 2.0 Å Crystal Structure of a Four-Domain Segment of Human Fibronectin Encompassing the RGD Loop and Synergy Region. *Cell* 84, 155–164.
- Leahy, D.J., Erickson, H.P., Aukhil, I., Joshi, P., and Hendrickson, W.A. (1994). Crystallization of a fragment of human fibronectin: introduction of methionine by site-directed mutagenesis to allow phasing via selenomethionine. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 19, 48–54.
- Leclerc, E., Sakai, Y., and Fujii, T. (2003). Cell Culture in 3-Dimensional Microfluidic Structure of PDMS (polydimethylsiloxane). *Biomedical Microdevices* 5, 109–114.
- Li, F., Redick, S.D., Erickson, H.P., and Moy, V.T. (2003). Force Measurements of the $\alpha 5 \beta 1$ Integrin-Fibronectin Interaction. *Biophysical Journal* 84, 1252–1262.
- Li, H. (2011). 2.09 - Protein Nanomechanics. In *Comprehensive Nanoscience and Technology*, Editors-in-Chief: David L. Andrews, Gregory D. Scholes, and Gary P. Wiederrecht, eds. (Amsterdam: Academic Press), pp. 227–261.
- Li, H., Rief, M., Oesterhelt, F., and Gaub, H.E. (1998). Single-Molecule Force Spectroscopy on Xanthan by AFM. *Advanced Materials* 10, 316–319.
- Lien, W.-H., Klezovitch, O., and Vasioukhin, V. (2006). Cadherin–catenin proteins in vertebrate development. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 499–506.
- Litvinovich, S.V., Brew, S.A., Aota, S., Akiyama, S.K., Haudenschild, C., and Ingham, K.C. (1998). Formation of amyloid-like fibrils by self-association of a partially unfolded fibronectin type III module. *Journal of Molecular Biology* 280, 245–258.
- Liu, G., Hultin, M., Ostergaard, P., and Olivecrona, T. (1992). Interaction of size-fractionated heparins with lipoprotein lipase and hepatic lipase in the rat. *Biochemical Journal* 285, 731.
- Liu, S. (2000). Paxillin Binding to a Conserved Sequence Motif in the $\alpha 4$ Integrin Cytoplasmic Domain. *Journal of Biological Chemistry* 275, 22736–22742.
- Liu, S., Calderwood, D., and Ginsberg, M. (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 113, 3563–3571.
- Lord, M.S., Foss, M., and Besenbacher, F. (2010). Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response. *Nano Today* 5, 66–78.
- Lu, H., and Schulten, K. (2000). The Key Event in Force-Induced Unfolding of Titin's Immunoglobulin Domains. *Biophysical Journal* 79, 51–65.
- Lubarsky, G.V., Browne, M.M., Mitchell, S.A., Davidson, M.R., and Bradley, R.H. (2005). The influence of electrostatic forces on protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 44, 56–63.
- Lucena, S., Arocha Piñango, C., and Guerrero, B. (2007). Fibronectin. Structure and functions associated to hemostasis. *Review. Invest Clin* 48, 249–262.
- Lukashev, M.E., and Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends in Cell Biology* 8, 437–441.
- Luo, B.H., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual Review of Immunology* 25, 619.
- Lüthen, F., Lange, R., Becker, P., Rychly, J., Beck, U., and Nebe, J.G.B. (2005). The influence of surface roughness of titanium on $\beta 1$ - and $\beta 3$ -integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells. *Biomaterials* 26, 2423–2440.
- Lyons, J., Furlong, D., and Healy, T. (1981). The electrical double-layer properties of the mica (muscovite)-aqueous electrolyte interface. *Aust. J. Chem.* 34, 1177–1187.
- Machovich, R. (1975). Mechanism of action of heparin through thrombin on blood coagulation. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 412, 13–17.
- Manning, G.S. (1969). Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions I. Colligative Properties. *The Journal of Chemical Physics* 51, 924–933.
- Manning, G.S., and Ray, J. (1998). Counterion Condensation Revisited. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 16, 461–476.
- Marra, J. (1986). Direct measurement of the interaction between phosphatidylglycerol bilayers in aqueous electrolyte solutions. *Biophysical Journal* 50, 815–825.

- Marszalek, P., Zieliński, J.J., and Fikus, M. (1989). Experimental verification of a theoretical treatment of the mechanism of dielectrophoresis. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 276, 289–298.
- Marszalek, P.E., Lu, H., Li, H., Carrion-Vazquez, M., Oberhauser, A.F., Schulten, K., and Fernandez, J.M. (1999). Mechanical unfolding intermediates in titin modules. *Nature* 402, 100–103.
- Marszalek, P.E., Oberhauser, A.F., Pang, Y.-P., and Fernandez, J.M. (1998). Polysaccharide elasticity governed by chair-boat transitions of the glucopyranose ring. *Nature* 396, 661–664.
- Marti, O. (2006). *Mechanik deformierbarer Körper* (Ulm).
- Matschegewski, C., Staehle, S., Loeffler, R., Lange, R., Chai, F., Kern, D.P., Beck, U., and Nebe, B.J. (2010). Cell architecture–cell function dependencies on titanium arrays with regular geometry. *Biomaterials* 31, 5729–5740.
- Matsumoto, H., Terada, T., Tsuura, M., Itakura, T., and Ogawa, A. (2003). Basic Fibroblast Growth Factor Released from a Platinum Coil with a Polyvinyl Alcohol Core Enhances Cellular Proliferation and Vascular Wall Thickness: An in Vitro and in Vivo Study. *Neurosurgery* 53, 402–408 10.1227/01.NEU.0000073728.82721.8E.
- May, S., Iglič, A., Reščič, J., Maset, S., and Bohinc, K. (2008). Bridging Like-Charged Macroions through Long Divalent Rodlike Ions. *The Journal of Physical Chemistry B* 112, 1685–1692.
- Mesarovic, S.D., and Fleck, N.A. (1999). Spherical indentation of elastic-plastic solids. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 455, 2707–2728.
- Meschede, D. (2004). *Gerthsen Physik* (Heidelberg: Springer).
- Miller, J.R., and Moon, R.T. (1996). Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes & Development* 10, 2527–2539.
- Miller, L.A., Stubblefield, K.A., Lipschutz, R.D., Lock, B.A., and Kuiken, T.A. (2008). Improved Myoelectric Prosthesis Control Using Targeted Reinnervation Surgery: A Case Series. *Neural Systems and Rehabilitation Engineering, IEEE Transactions On* 16, 46–50.
- Mitternacht, S., Luccioli, S., Torcini, A., Imparato, A., and Irbäck, A. (2009). Changing the Mechanical Unfolding Pathway of FnIII10 by Tuning the Pulling Strength. *Biophysical Journal* 96, 429–441.
- Moos, P.J., Chung, K., Woessner, D., Honegger, M., Cutler, N.S., and Veranth, J.M. (2010). ZnO Particulate Matter Requires Cell Contact for Toxicity in Human Colon Cancer Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 733–739.
- Morris, V.J., Kirby, A.R., and Gunning, A.P. (2010). *Atomic Force Microscopy for Biologists* (London: Imperial College Press).
- Müller, D.J., Krieg, M., Alsteens, D., and Dufrêne, Y.F. (2009). New frontiers in atomic force microscopy: analyzing interactions from single-molecules to cells. *Current Opinion in Biotechnology* 20, 4–13.
- Muthukumar, S., and DesRoches, R. (2006). A Hertz contact model with non-linear damping for pounding simulation. *Earthquake Engng. Struct. Dyn.* 35, 811–828.
- N'Dri, N.A., Shyy, W., and Tran-Son-Tay, R. (2003). Computational Modeling of Cell Adhesion and Movement Using a Continuum-Kinetics Approach. *Biophysical Journal* 85, 2273–2286.
- Nath, D., Slocombe, P.M., Webster, A., Stephens, P.E., Docherty, A.J., and Murphy, G. (2000). Meltrin gamma(ADAM-9) mediates cellular adhesion through alpha(6)beta(1)integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. *Journal of Cell Science* 113, 2319–2328.
- Needham, D., and Nunn, R.S. (1990). Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophysical Journal* 58, 997–1009.
- Ng, S.P., Billings, K.S., Ohashi, T., Allen, M.D., Best, R.B., Randles, L.G., Erickson, H.P., and Clarke, J. (2007). Designing an extracellular matrix protein with enhanced mechanical stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 9633.
- Nishimura, S., Tateyama, H., Tsunematsu, K., and Jinnai, K. (1992). Zeta potential measurement of muscovite mica basal plane-aqueous solution interface by means of plane interface technique. *Journal of Colloid and Interface Science* 152, 359–367.
- Nonnenmacher, M., OBoyle, M.P., and Wickramasinghe, H.K. (1991). Kelvin probe force microscopy.
- Oberhauser, A.F., Badilla-Fernandez, C., Carrion-Vazquez, M., and Fernandez, J.M. (2002). The mechanical hierarchies of fibronectin observed with single-molecule AFM. *Journal of Molecular Biology* 319, 433–447.
- Oliva, A., Della Ragione, F., Salerno, A., Riccio, V., Tartaro, G., Cozzolino, A., D'Amato, S., Pontoni, G., and Zappia, V. (1996). Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. *Biomaterials* 17, 1351–1356.
- Oosawa, F. (1970). Counterion fluctuation and dielectric dispersion in linear polyelectrolytes. *Biopolymers* 9, 677–688.
- Ozawa, Y., Shimizu, N., Kariya, G., and Abiko, Y. (1998). Low-Energy Laser Irradiation Stimulates Bone Nodule Formation at Early Stages of Cell Culture in Rat Calvarial Cells. *Bone* 22, 347–354.
- Pace, C.N. (1986). [14]Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. In *Methods in Enzymology*, S.N.T. C. H. W. Hirs, ed. (Academic Press), pp. 266–280.
- Paci, E., and Karplus, M. (1999). Forced unfolding of fibronectin type 3 modules: an analysis by biased molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Biology* 288, 441–459.
- Palumbo, B.T., Henderson, E.R., Groundland, J.S., Cheong, D., Pala, E., Letson, G.D., and Ruggieri, P. (2011). Advances in segmental endoprosthetic reconstruction for extremity tumors: a review of contemporary designs and techniques. *Cancer Control* 18, 160–170.
- Pashley, R.. (1981). DLVO and hydration forces between mica surfaces in Li⁺, Na⁺, K⁺, and Cs⁺ electrolyte solutions: A correlation of double-layer and hydration forces with surface cation exchange properties. *Journal of Colloid and Interface Science* 83, 531–546.

- Pawlowski, P., and Fikus, M. (1993). Bioelectrorheological model of the cell. 4. Analysis of the extensile deformation of cellular membrane in alternating electric field. *Biophysical Journal* 65, 535–540.
- Pawłowski, P., Szutowicz, I., Marszałek, P., and Fikus, M. (1993). Bioelectrorheological model of the cell. 5. Electrodestruction of cellular membrane in alternating electric field. *Biophysical Journal* 65, 541–549.
- Pawlowski, P., Szutowicz, I., Różycki, S., Zieliński, J., and Fikus, M. (1996). Bioelectrorheological model of the cell. VI. Experimental verification of the rheological model of cytoplasmic membrane. *Biophysical Journal* 70, 1024–1026.
- Pelham, R.J., and Wang, Y. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 13661–13665.
- Potts, J.R., and Campbell, I.D. (1996). Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biology* 15, 313–320.
- Powell, J.J., Ainley, C.C., Harvey, R.S., Mason, I.M., Kendall, M.D., Sankey, E.A., Dhillon, A.P., and Thompson, R.P. (1996). Characterisation of inorganic microparticles in pigment cells of human gut associated lymphoid tissue. *Gut* 38, 390–395.
- Poznanski, J., Pawlowski, P., and Fikus, M. (1992). Bioelectrorheological model of the cell. 3. Viscoelastic shear deformation of the membrane. *Biophysical Journal* 61, 612–620.
- Price, R.L., Ellison, K., Haberstroh, K.M., and Webster, T.J. (2004). Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *J. Biomed. Mater. Res. A* 70A, 129–138.
- Price, R.L., Waid, M.C., Haberstroh, K.M., and Webster, T.J. (2003). Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers. *Biomaterials* 24, 1877–1887.
- Puech, P.-H., Poole, K., Knebel, D., and Muller, D.J. (2006). A new technical approach to quantify cell–cell adhesion forces by AFM. *Ultramicroscopy* 106, 637–644.
- Puttock, M., and Thwaite, G. (1969). Elastic compression of spheres and cylinders at point and line contact. (Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization).
- Qu, P., Lu, H., Ding, X., Tao, Y., and Lu, Z. (2009). Influences of urea and guanidine hydrochloride on the interaction of 6-thioguanine with bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 74, 1224–1228.
- Quigley, G.J., Teeter, M.M., and Rich, A. (1978). Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75, 64–68.
- Ranella, A., Barberoglou, M., Bakogianni, S., Fotakis, C., and Stratakis, E. (2010). Tuning cell adhesion by controlling the roughness and wettability of 3D micro/nano silicon structures. *Acta Biomaterialia* 6, 2711–2720.
- Raucher, D., and Sheetz, M.P. (1999). Characteristics of a Membrane Reservoir Buffering Membrane Tension. *Biophysical Journal* 77, 1992–2002.
- Rauvala, H., Carter, W.G., and Hakomori, S.I. (1981). Studies on cell adhesion and recognition. I. Extent and specificity of cell adhesion triggered by carbohydrate-reactive proteins (glycosidases and lectins) and by fibronectin. *The Journal of Cell Biology* 88, 127–137.
- Rauvala, H., and Hakomori, S. (1981). Studies on cell adhesion and recognition. III. The occurrence of α -mannosidase at the fibroblast cell surface, and its possible role in cell recognition. *The Journal of Cell Biology* 88, 149–159.
- Reimhult, E., Höök, F., and Kasemo, B. (2002). Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure†. *Langmuir* 19, 1681–1691.
- Rezwani, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J., and Boccaccini, A.R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 3413–3431.
- Rider, J.E., Hacker, A., Mackintosh, C.A., Pegg, A.E., Woster, P.M., and Casero, R.A. (2007). Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids* 33, 231–240.
- Riedel, E. (1994). *Anorganische Chemie* (New York: de Gruyter).
- Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J.M., and Gaub, H.E. (1997). Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM. *Science* 276, 1109–1112.
- Roach, P., Farrar, D., and Perry, C.C. (2005). Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 8168–8173.
- Roach, P., Farrar, D., and Perry, C.C. (2006). Surface Tailoring for Controlled Protein Adsorption: Effect of Topography at the Nanometer Scale and Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 3939–3945.
- Rosenbluth, M.J., Lam, W.A., and Fletcher, D.A. (2006). Force Microscopy of Nonadherent Cells: A Comparison of Leukemia Cell Deformability. *Biophysical Journal* 90, 2994–3003.
- Rounsevell, R., Forman, J.R., and Clarke, J. (2004). Atomic force microscopy: mechanical unfolding of proteins. *Methods* 34, 100–111.
- Rubin, C., Xu, G., and Judex, S. (2001). The anabolic activity of bone tissue, suppressed by disuse, is normalized by brief exposure to extremely low-magnitude mechanical stimuli. *The FASEB Journal* 15, 2225–2229.
- Ruoslahti, E. (1991). Integrins. *J. Clin. Invest.* 87, 1–5.
- Russell, D., and Snyder, S.H. (1968). Amine Synthesis in Rapidly Growing Tissues: Ornithine Decarboxylase Activity in Regenerating Rat Liver, Chick Embryo, and Various Tumors. *PNAS* 60, 1420–1427.
- Salter, D.M., Robb, J.E., and Wright, M.O. (1997). Electrophysiological Responses of Human Bone Cells to Mechanical Stimulation: Evidence for Specific Integrin Function in Mechanotransduction. *Journal of Bone and Mineral Research* 12, 1133–1141.

- Sasanaluckit, P., Albustany, K.R., Doherty, P.J., and Williams, D.F. (1993). Biocompatibility of glass ionomer cements. *Biomaterials* **14**, 906–916.
- Scalabrino, G., and Ferioli, M.E. (1984). Polyamines in mammalian ageing: An oncological problem, too? A review. *Mechanisms of Ageing and Development* **26**, 149–164.
- Scharnweber, D., Beutner, R., Röblier, S., and Worch, H. (2002). Electrochemical behavior of titanium-based materials – are there relations to biocompatibility? *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **13**, 1215–1220.
- Schmidt-Rohlfing, B., Silny, J., Gavenis, K., and Heussen, N. (2011). Elektromagnetische Felder, elektrischer Strom und Knochenheilung: was ist gesichert? *Z Orthop Unfall* **149**, 265–270.
- Schneider, G.B., Zaharias, R., and Stanford, C. (2001). Osteoblast Integrin Adhesion and Signaling Regulate Mineralization. *Journal of Dental Research* **80**, 1540–1544.
- Schwartz, M.A., and Assoian, R.K. (2001). Integrins and cell proliferation. *Journal of Cell Science* **114**, 2553–2560.
- Secomb, T.W. (1987). Flow-dependent rheological properties of blood in capillaries. *Microvascular Research* **34**, 46–58.
- Sha, Q., Romano, C., Lopatin, A.N., and Nichols, C.G. (1996). Spermidine Release from *Xenopus* Oocytes. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 3392–3397.
- Shaw, L.M., Rabinovitz, I., Wang, H.H.-F., Toker, A., and Mercurio, A.M. (1997). Activation of Phosphoinositide 3-OH Kinase by the $\alpha 6 \beta 4$ Integrin Promotes Carcinoma Invasion. *Cell* **91**, 949–960.
- Shimogori, T., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. (1996). Spermidine Regulation of Protein Synthesis at the Level of Initiation Complex Formation of Met-tRNA_i, mRNA and Ribosomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **223**, 544–548.
- Shirato, M., Murase, T., Iwata, M., and Nakatsuka, S. (1986). The Terzaghi-Voigt combined model for constant-pressure consolidation of filter cakes and homogeneous semi-solid materials. *Chemical Engineering Science* **41**, 3213–3218.
- Siegel, D.P., and Kozlov, M.M. (2004). The Gaussian Curvature Elastic Modulus of N-Monomethylated Dioleoylphosphatidylethanolamine: Relevance to Membrane Fusion and Lipid Phase Behavior. *Biophysical Journal* **87**, 366–374.
- Di Silvio, L., Gurav, N., and Eleftherios Tsiridis (2008). Tissue Engineering of Bone. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, (Informa Healthcare), pp. 2652–2659.
- Singhvi, R., Stephanopoulos, G., and Wang, D.I.C. (1994). Effects of substratum morphology on cell physiology. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 764–771.
- Smith, S.B., Cui, Y., and Bustamante, C. (1996). Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules. *Science* **271**, 795–799.
- Snyder, S.H., Kreuz, D.S., Medina, V.J., and Russell, D.H. (1970). POLYAMINE SYNTHESIS AND TURNOVER IN RAPIDLY GROWING TISSUES*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **171**, 749–771.
- Solon, J., Levental, I., Sengupta, K., Georges, P.C., and Janmey, P.A. (2007). Fibroblast Adaptation and Stiffness Matching to Soft Elastic Substrates. *Biophysical Journal* **93**, 4453–4461.
- Staatz, W.D., Fok, K.F., Zutter, M.M., Adams, S.P., Rodriguez, B.A., and Santoro, S.A. (1991). Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the $\alpha 2 \beta 1$ integrin in collagen. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 7363–7367.
- Stevens, M.M., and George, J.H. (2005). Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. *Science* **310**, 1135–1138.
- Strunz, T., Oroszlan, K., Schäfer, R., and Güntherodt, H.-J. (1999). Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 11277–11282.
- Szleifer, I. (1997). Protein Adsorption on Surfaces with Grafted Polymers: A Theoretical Approach. *Biophysical Journal* **72**, 595–612.
- Tabor, C., and Tabor, H. (1984). Polyamines. *Annual Review of Biochemistry* **53**, 749–790.
- Takagi, J., Strokovich, K., Springer, T.A., and Walz, T. (2003). Structure of integrin $[\alpha]5[\beta]1$ in complex with fibronectin. *EMBO J* **22**, 4607–4615.
- Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**, 1451–1455.
- Tanaka, S.M., Li, J., Duncan, R.L., Yokota, H., Burr, D.B., and Turner, C.H. (2003). Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts. *Journal of Biomechanics* **36**, 73–80.
- Tapley, P., Horwitz, A., Buck, C., Duggan, K., and Rohrschneider, L. (1989). Integrins isolated from Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts. *Oncogene* **4**, 325–333.
- Taubenberger, A., Cisneros, D.A., Friedrichs, J., Puech, P.-H., Muller, D.J., and Franz, C.M. (2007). Revealing Early Steps of $\alpha 2 \beta 1$ Integrin-mediated Adhesion to Collagen Type I by Using Single-Cell Force Spectroscopy. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 1634–1644.
- Timoshenko, S.P., and Gere, J.M. (2002). *Mechanics of Materials* (Boston: PWS Publishing Co.).
- Tulla, M., Helenius, J., Jokinen, J., Taubenberger, A., Müller, D.J., and Heino, J. (2008). TPA primes $\alpha 2 \beta 1$ integrins for cell adhesion. *FEBS Letters* **582**, 3520–3524.
- Ulrich, F., Krieg, M., Schötz, E.-M., Link, V., Castanon, I., Schnabel, V., Taubenberger, A., Mueller, D., Puech, P.-H., and Heisenberg, C.-P. (2005). Wnt11 Functions in Gastrulation by Controlling Cell Cohesion through Rab5c and E-Cadherin. *Developmental Cell* **9**, 555–564.
- Verwey, E.J.W. (1947). Theory of the stability of lyophobic colloids. *The Journal of Physical Chemistry* **51**, 631–636.
- Vince, V., Thil, M.-A., Veraart, C., Colin, I.M., and Delbeke, J. (2004). Biocompatibility of platinum-metallized silicone rubber: in vivo and in vitro evaluation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **15**, 173–188.

- van Wachem, P., Hogt, A., Beugeling, T., Feijen, J., Bantjes, A., Detmers, J., and van Aken, W. (1987). Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge. *Biomaterials* 8, 323–328.
- Wagner, J. (2010). Vorlesung PC II - Transportphänomene und Kinetik (Rostock).
- Wagner, J. (2011). Thermodynamik (Rostock: Universität Rostock).
- Wang, M.D., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., and Block, S.M. (1997). Stretching DNA with optical tweezers. *Biophysical Journal* 72, 1335–1346.
- Webb, K., Hlady, V., and Tresco, P.A. (1998). Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. *J. Biomed. Mater. Res.* 41, 422–430.
- Weiss, L. (1961). The measurement of cell adhesion. *Experimental Cell Research* 8, *Supplement*, 141–153.
- Wennerström, H., Jönsson, B., and Linse, P. (1982). The cell model for polyelectrolyte systems. Exact statistical mechanical relations, Monte Carlo simulations, and the Poisson–Boltzmann approximation. *The Journal of Chemical Physics* 76, 4665.
- Werb, Z., Tremble, P.M., Behrendtsen, O., Crowley, E., and Damsky, C.H. (1989). Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *The Journal of Cell Biology* 109, 877–889.
- Williams, K. (1997). Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem. J.* 325, 289–297.
- Williams, M.C., and Rouzina, I. (2002). Force spectroscopy of single DNA and RNA molecules. *Current Opinion in Structural Biology* 12, 330–336.
- Woods, A., Longley, R.L., Tumova, S., and Couchman, J.R. (2000). Syndecan-4 Binding to the High Affinity Heparin-Binding Domain of Fibronectin Drives Focal Adhesion Formation in Fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 374, 66–72.
- Wozniak, M.A., Modzelewska, K., Kwong, L., and Keely, P.J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1692, 103–119.
- Wu, H.W., Kuhn, T., and Moy, V.T. (1998). Mechanical properties of L929 cells measured by atomic force microscopy: Effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking. *Scanning* 20, 389–397.
- Xiong, J.-P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S.L., and Arnaout, M.A. (2002). Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin α V β 3 in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand. *Science* 296, 151–155.
- Yalow, R.S., and Berson, S.A. (1960). Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *Obesity Research* 4, 583–600.
- Yang, J.T., Rayburn, H., and Hynes, R.O. (1995). Cell adhesion events mediated by α 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* 121, 549–560.
- Yawata, Y. (2003). *Cell Membrane - The red blood cell as a model* (Weinheim: Wiley-VCH).
- Yeung, T., Georges, P.C., Flanagan, L.A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., and Janmey, P.A. (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil. Cytoskeleton* 60, 24–34.
- Yew, Z.T., and Paci, E. (2012). 3.7 Simulation Studies of Force-Induced Unfolding. In *Comprehensive Biophysics*, Editor-in-Chief: Edward H. Egelman, ed. (Amsterdam: Elsevier), pp. 138–147.
- Yoshida, M., Meksuriyen, D., Kashiwagi, K., Kawai, G., and Igarashi, K. (1999). Polyamine Stimulation of the Synthesis of Oligopeptide-binding Protein (OppA). *Journal of Biological Chemistry* 274, 22723–22728.
- Yoshikawa, T., Peel, S.A.F., Gladstone, J.R., and Davies, J.E. (1997). Biochemical analysis of the response in rat bone marrow cell cultures to mechanical stimulation. *Bio-Medical Materials and Engineering* 7, 369–377.
- Yoshimoto, H., Shin, Y.M., Terai, H., and Vacanti, J.P. (2003). A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* 24, 2077–2082.
- Young, T. (1805). An Essay on the Cohesion of Fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 95, 65–87.
- Zaman, M.H., Trapani, L.M., Sieminski, A.L., MacKellar, D., Gong, H., Kamm, R.D., Wells, A., Lauffenburger, D.A., and Matsudaira, P. (2006). Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 10889–10894.
- Zhang, G., Wei, Z., and Ferrell, R.E. (2009). Elastic modulus and hardness of muscovite and rectorite determined by nanoindentation. *Applied Clay Science* 43, 271–281.
- Zhu, C. (2000). Kinetics and mechanics of cell adhesion. *J Biomech* 33, 23–33.
- Zou, S., Korczagin, I., Hempenius, M.A., Schönherr, H., and Vancso, G.J. (2006). Single molecule force spectroscopy of smart poly(ferrocenylsilane) macromolecules: Towards highly controlled redox-driven single chain motors. *Polymer* 47, 2483–2492.
- Zuckermann, M.J., and Heimburg, T. (2001). Insertion and Pore Formation Driven by Adsorption of Proteins Onto Lipid Bilayer Membrane–Water Interfaces. *Biophysical Journal* 81, 2458–2472.
- Zweymüller, K., Lintner, F., and Semlitsch, M. (1988). Biologic fixation of a press-fit titanium hip joint endoprosthesis. *Clin Orthop Relat Res* 195–206.

10 Liste eigener Veröffentlichungen

10.1 Publikationen

Elter, P., Weihe, T., Buehler, S.M., Gimsa, J., Beck, U. (2011). Low fibronectin concentrations overcompensate for reduced initial fibroblasts adhesion to a nanoscale topography: Single-cell force spectroscopy. *Colloids Surf. B* 95, 82-89;

DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.02.026. *Impact factor: 2.9.*

Elter, P.; Weihe, T., Lange, Regina, Gimsa, J., Beck, U. (2011) The influence of topographic microstructures on the initial adhesion of L929 fibroblasts studied by single-cell force spectroscopy. *Eur Biophys J. B* 40 317-327;

DOI: 10.1007/s00249-010-0649-0. *Impact factor: 2.139*

Weihe, T., Bonk, S., Elter, P. and Gimsa, J., (2010) Ein-Zell Kraftspektroskopie zur Bestimmung der initialen Adhäsion von Zellen auf verschiedenen Oberflächen. Analyse und Simulation von Wechselwirkungen von Implantaten und Biosystemen. (BMT, Rostock-Warnemünde) *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering*, 55 (1) ISSN (Online) 1862-278X, ISSN (Print) 0013-5585,

DOI: 10.1515/BMT.2010.712/October/2010, *Impact factor: 0.75*

Van Rienen, U., Appali, R., Bader, R., Baumann, W., Beck, U., Behrend, D., Benecke, R., Biala, K., Birkholz, H., Burkel, E., Engel, K., Ewald, H., Gimsa, J., Gimsa, U., Gongadze, E., Grünbaum, A., Haba, Y., Liese, F., Liu, B., Lüder, M., Matschegewski, C., Mittelmeier, W., Mix, E., Nebe, B., Nowak, K.-A., Pahnke, J., Pau, H.-W., Pauleweit, S., Petersen, S., Polnick, S., Reimer, T., Rott, G., Salomon, R., Vinter, E., Weihe, T. and Wolkenhauer, O., 2010. Analyse und Simulation von Wechselwirkungen von Implantaten und Biosystemen. (BMT, Rostock-Warnemünde) *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering*, 55 (1) ISSN (Online) 1862-278X, ISSN (Print) 0013-5585

DOI: 10.1515/BMT.2010.712/October/2010. *Impact factor: 0.75*

10.2 Konferenzbeiträge

Thomas Weihe, Sebastian Bonk, Yiling Chen, Jan Gimsa: Single-Cell Force Spectroscopy for the determination of initial adhesion of L929 fibroblasts studied by single-cell force spectroscopy. BMT, Warnemünde, Germany (2010)

10.3 Posterbeiträge

Thomas Weihe, Sebastian Bonk: Single-Cell Force Spectroscopy for the determination of initial adhesion of cells to different surfaces. Bone Tech, Hannover, Germany (2010).

Thomas Weihe, Sarka Perutkova, Patrick Elter, Veronika Kralj-Iglic, Ales Iglic und Jan Gimsa: Describing electrostatic attraction between negatively charged objects mediated by organic counter-ions of different length. Gordon Research Conference, Bioelectrochemistry, Biddeford, ME, USA (2010)

Thomas Weihe, Sarka Perutkova, Veronika Kralj-Iglic, Patrick Elter, Ales Iglic und Jan Gimsa: Describing electrostatic attraction between negatively charged objects mediated by organic counter-ions of different length. JPK Joint Meeting, Berlin, Germany (2010).

Thomas Weihe, Sarka Perutkova, Veronika Kralj-Iglic, Patrick Elter, Ales Iglic und Jan Gimsa: pH dependence of electrostatic attraction between negatively charged objects by organic counter-ions. Biophysical Society, 55th Annual Meeting, Baltimore, MD, USA (2011).

11 Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Charakterisierung ausgewählter molekularer und zellulärer Mechanismen an der artifiziellen Oberfläche“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe sowie ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe. Die vorliegende Arbeit wurde in dieser oder anderer Form bisher nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt.

Thomas Weihe

12 Danksagungen

Ich möchte Herrn Prof. Dr. habil. Jan Gimsa herzlich dafür danken, dass er es mir ermöglicht hat am Lehrstuhl für Biophysik zu promovieren. Weiterhin möchte ich ihm und Dr. Werner Baumann für ihre freundliche und kompetente Art der Führung und Wissensvermittlung während der letzten Jahre danken. Herrn Dr. Patrick Elter möchte ich für seine ausführliche Einführung in die Methodik und für seine nicht endende Geduld bei meinen häufigen Fragen danken. Prof. Dr. Piotr Marszalek und Prof. Dr. Ales Iglic danke ich für die freundliche Aufnahme während meiner Zeit im Ausland und die vielen fruchtbaren Hinweise während meiner Studien.

Besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. habil. Ursula van Rienen und Prof. Dr. habil. Wolfram Mittelmeier, die zusammen mit Prof. Dr. habil. Jan Gimsa das Welisa-Graduiertenkolleg ermöglicht haben.

Den Kolleginnen und Kollegen am Lehrstuhl für Biophysik danke ich für die angenehme Atmosphäre sowie ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Im Besonderen möchte ich jedoch meinen Eltern danken, für alles.

